



Deutsches Herzzentrum Berlin

Klinik für angeborene Herzfehler
(Direktor: Prof. Dr. Peter E. Lange)

Untersuchungen zur Entwicklung neuroprotektiver Strategien bei operativer Behandlung angeborener Herzfehler

HABILITATIONSSCHRIFT

zur Erlangung der Lehrbefähigung im Fach Pädiatrie

vorgelegt der medizinischen Fakultät Charité der Humboldt-Universität zu Berlin

von

Dr. med. Hashim Abdul-Khaliq

geboren in Arrabah-Palästina

Präsident: Prof. Dr. J. Mlynek

Dekan: Prof. Dr. J. W. Dudenhausen

Gutachter: 1. Prof. Dr. Michael Vogel

2. Prof. Dr. A. Huri

Datum des öffentlich-wissenschaftlichen Vortrages: 01.10.2002

INHALTSVERZEICHNIS

Abbildungsverzeichnis	6
Tabellenverzeichnis	12
1. Einleitung:	13
1.1.	13
1.2. Neuroprotektion während herzchirurgischer Eingriffe.	15
1.2.1. intraoperative Hypothermie.....	15
1.2.2. Regulation des Säure-Basen-Haushaltes	15
1.2.3. Retrograde zerebrale Perfusion	15
1.2.4. Modifizierte Ultrafiltration.....	16
1.2.5. Pulsatiler und nicht-pulsatiler Bypassfluss	16
1.2.6. Postoperative moderate Hypothermie	16
1.2.7. Pharmakologische Intervention durch Gabe von neurospezifischen protektiven Substanzen.....	17
2. Hirnschädigung nach chirurgischer Behandlung angeborener Herzfehler	18
2.1. Abnorme ultrasonographische Befunde nach Korrekturoperationen angeborener Herzfehler in der neonatalen Periode.	18
2.1.1. Hirnparenchymatöse Blutung.....	19
2.2. Evaluierung pathologischer intrakranieller Befunde mit dem 3D -Ultraschall.....	19
2.2.1. Methode	20
2.2.2. Patienten	20
2.2.3. Ergebnisse	20
2.3. Neuropathologische Analyse von Hirnveränderungen bei verstorbenen Kindern mit angeborenen Herzfehlern	22
2.3.1. Methode:	22
2.3.2. Ergebnisse:	23
2.4. Psychiatrische Komorbidität und kognitive Entwicklung bei Schulkindern mit Fallotscher Tetralogie.....	25
2.4.1. Methodik:	25
2.4.2. Ergebnisse:	25
3. Untersuchung der zerebralen Perfusion während und nach Korrekturoperationen angeborener Herzfehler	27
3.1. Veränderung der zerebralen Perfusion nach Korrekturoperationen angeborener Herzfehler.....	27
3.1.1. Transkranielle Dopplersonographie	27
3.1.2. Ergebnisse	28
3.1.3. Einflussfaktoren auf die Veränderung des zerebralen Flussmusters während Korrekturoperationen angeborener Herzfehler	30
3.1.4. Einfluss des Kreislaufstillstandes	30
3.2. Veränderung der zerebralen Perfusion nach Korrekturoperationen angeborener Herzfehler.....	31

3.2.1. Ergebnisse	31
3.2.2. Zusammenhang zwischen der Veränderung in der zerebralen Perfusion und dem Auftreten zerebraler Schädigung in der postoperativen Phase.....	33
4. Veränderung der zerebralen Oxygenation während und nach Korrekturoperationen angeborener Herzfehler	35
4.1. Nahinfrarot-Spektroskopie	35
4.1.1. Validisierung des Zerebraloxyimeters INVOS 3100A	35
4.1.1.1. Patienten und Methoden	35
4.1.1.2. Ergebnisse.....	37
4.1.2. Intraoperatives Monitoring der regionalen Hämoglobinsättigung	37
4.1.3. Einfluss intraoperativer Faktoren auf den Verlauf der rSO2	38
4.1.4. Einfluss der modifizierten Ultrafiltration auf die postoperativen Werte der rSO2	39
4.1.4.1. modifizierte Ultrafiltration (MUF)	39
4.1.4.2. Ergebnisse.....	39
4.2. Veränderung der rSO2 während der postoperativen Phase.....	40
4.2.1. Methodik:	40
4.2.2. Ergebnisse	41
4.2.3. Messung der intrazellulären Oxygenation.....	42
4.2.4. Zusammenhang zwischen intravaskulärer und intrazellulärer Oxygenation	42
4.2.4.1. Methode	43
4.2.4.2. Ergebnisse.....	43
5. Biochemische Marker für die Hirnschädigung nach Korrekturoperationen angeborener Herzfehler	45
5.1. Protein S-100B	45
5.1.1. S-100B Serumwerte nach herzchirurgischen Eingriffen im Kleinkindesalter	46
5.1.2. Methode	46
5.1.3. Ergebnisse	48
5.2. Zusammenhang zur Veränderung der zerebralen Oxygenation.....	50
5.2.1. Patienten und Methoden.....	50
5.2.2. Ergebnisse	51
5.3. Zusammenhang zum Sauerstoffradikalmetabolismus.....	51
5.3.1. Methode	51
5.3.2. Ergebnisse	52
5.4. Einfluss der intraoperativen Medikation mit Natrium Nitroprussid auf die postoperativen Serumwerte des S-100B	54
5.4.1. Methode	54
5.4.2. Ergebnisse	54
5.5. Einfluss der modifizierten Ultrafiltration auf die postoperativen Werte des S-100B	55
5.5.1. Modifizierte Ultrafiltration (siehe 4.1.2).....	55
5.5.2. Ergebnisse	56
6. Neurophysiologische und neuropathologische Untersuchungen während der extrakorporalen Zirkulation mit tief hypothermem Kreislaufstillstand an einem Kleintiermodell.....	57

6.1. Extrakorporale Zirkulation mit tief hypothermem Kreislaufstillstand an einem Kaninchenmodell	58
6.1.1. Vorbereitung und Narkoseführung	58
6.1.2. Extrakorporale Zirkulation	59
6.1.3. Neuromonitoring	60
6.1.3.1. Transkranielle Dopplersonographie	60
6.1.4. Nahinfrarot-Spektroskopie (NIRS)	61
6.1.5. Evaluierung der regionalen Hirnperfusion mittels Mikrosphären	61
6.1.6. Biochemische Marker für die zerebrale Ischämie	63
7. Morphologie des Gehirns nach extrakorporaler Zirkulation und tief hypothermem Kreislaufstillstand	64
7.1. Histologie	64
7.1.1. Protein S-100B	65
7.1.2. Neuronenspezifische Enolase (NSE)	65
7.1.3. Parvalbumin	66
7.2. Elektronenmikroskopie	66
7.3. Modus der neuronalen Zellschädigung nach extrakorporaler Zirkulation und tief hypothermem Kreislaufstillstand	66
7.3.1. Nekrose	67
7.3.2. Apoptose	67
7.4. Ergebnisse	69
7.4.1. Schädigungsmuster im Zentralnervensystem nach EKZ und tief hypothermem Kreislaufstillstand	69
7.4.1.1 Morphologische Aspekte nach EKZ	69
7.4.1.2. Morphologische Aspekte nach tief hypothermem Kreislaufstillstand	69
7.4.2. Zerebrale Oxygenation	70
7.4.3. Zerebrale Perfusion	72
7.4.3.1 Beurteilung der zerebralen Flussgeschwindigkeiten mit transkranieller Dopplersonographie (TCD)	72
7.4.3.2. Beurteilung der regionalen zerebralen Perfusion mit Mikrosphären	72
7.4.4. Wertigkeit des zerebralen Markers S-100B im Serum als Marker einer Störung in der Bluthirn-Schranke.	73
7.4.5. Immunhistochemische Veränderung des Proteins S-100B	75
7.4.6. Messung der neuronalen Marker in Serum und Liquor	76
7.4.7. Immunhistochemischer Nachweis der neuronalen Marker im Zentralnervensystem	79
8. Neuroprotektive Strategien durch Vorbehandlung mit verschiedenen Pharmaka an einem Schweinemodell	80
8.1. Vorbehandlung mit hoch dosierten Steroiden	80
8.1.1. Methode	81
8.1.2. Ergebnisse	81
8.1.2.1. Evaluierung der regionalen Hirnperfusion mittels Mikrosphären	81
8.1.2.2. Evaluierung der regionalen Hirnperfusion mittels TCD	82
8.1.2.3. Zerebrale Oxygenation	83

8.1.2.4.Biochemische Marker	84
8.1.2.5.Hyperglykämie	85
8.1.2.6.Auswertung der hypoxisch und apoptotischen neuronalen Zellschädigung.....	85
8.2. Die Rolle des Cyclosporins und des FK506 im Zentralnervensystem.....	89
8.2.1.Methode	91
8.2.2.Ergebnisse	92
8.2.2.1.Zerebrale Perfusion.....	92
8.2.2.2.Zerebrale Oxygenation	93
8.2.2.3.Biochemische Marker	94
8.2.2.4.Auswertung des hypoxischen und apoptotischen neuronalen Zellverlusts	94
9. Diskussion	96
9.1. Erfassung der Hirnschädigung im Zusammenhang mit angeborenen Herzfehlern.....	96
9.2. Überwachung der zerebralen Perfusion während und nach der Korrekturoperationen angeborener Herzfehler	101
9.3. Überwachung der zerebralen Oxygenation während und nach Korrekturoperationen angeborener Herzfehler	103
9.3.1. Veränderung der regionalen Hämoglobinsättigung (rSO ₂) während der Operation	103
9.3.2. Veränderung der regionalen Hämoglobinsättigung (rSO ₂) während der postoperativen Phase	104
9.3.3. Veränderung der intrazellulären Oxygenation	105
9.4. Wertigkeit der Bestimmung zerebraler Marker im Serum zur Diagnose von Hirnaffektionen nach herzchirurgischen Eingriffen.....	106
9.4.1. Normale und pathologische Serumwerte des Proteins S-100B bei Kindern nach herzchirurgischen Eingriffen:.....	106
9.4.2. Protein S-100B als Marker der Schädigung der Blut-Hirnschranke:.....	108
9.4.3. Protein S-100B als Parameter der Neuroprotektion	108
9.4.4. Wertigkeit der Hirnmarker im Serum und Liquor	110
9.5. Neuroprotektive Strategien während tief hypothermem Kreislaufstillstand.....	112
9.5.1. Protektiver Effekt der Hypothermie	112
9.5.2. Protektiver Effekt der Vorbehandlung mit Steroiden	113
9.5.3. Protektiver Effekt der Vorbehandlung mit FK501	115
9.5.4. Protektiver Effekt der Vorbehandlung mit Cyclosporin A	117
9.6. Zusammenfassung:.....	119
10. Referenzen	121
11. Danksagung	158

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 2.1.1: Schädelultraschall zeigt eine intraventrikuläre Blutung Grad III (IVH III) im Seitenventrikel, welche den gesamten Ventrikel-raum füllt, bei einem 11 Tage alten Neuge-borenen mit d-TGA nach Switschoperation	18
Abbildung 2.1.2.: Coronarschnittebene des Gehirns zeigt ausgedehnte parenchymatöse Blutungen bei einem 14 Tage alten Neugeborenen mit einem Ductus-abhängigen Vitium (Mitralatresie mit hypoplastischem Aortenbogen) nach Entlassung aus der Geburtsklinik. Das Kind wurde im Schockzustand in die Klinik eingeliefert (art. pH 6.7) und das Schädelsonogramm zeigte den abgebildeten intrakraniellen Befund. Aufgrund der ausgedehnten Blutung konnte das Kind nicht operiert werden und starb an den Folgen seiner Komplikationen.....	19
Abbildung 2.2.1: . Multiple Schnittebenen durch den Schädel bei einem Neugeborenen mit Mitralatresie und massiver Parenchymblutung (PVH) im rechten Temporallappen. Die sagittale (A), coronare (B) und transversale Schnittebene sind aus dem 3-dimensionalen Datensatz dargestellt. Links oben (D) ist die entsprechende dreidimensionale Rekonstruktion der Läsion dargestellt, welche eine genaue Abgrenzung der räumlichen Ausdehnung der Blutung erlaubt.....	21
Abbildung 2.3.1: Erworbene neuro-pathologische Befunde bei verstorbenen Kindern mit angeborenen Herzfehlern. Die intraventrikulärer Plexusblutung wurde ebenfalls bei reifen Neugeborenen nach Korrekturoperationen beobachtet (A). Zu den erworbenen Hirnläsionen zählen auch Mikro- und Makroinfarkten (B). Die periventrikuläre Leukomalazie ist ein typische Komplikation des Frühgeborenen trat jedoch auch bei Neugeborenen mit angeborenen Herzfehlern nach Herzoperation (C).	23
Abbildung 2.3.2: Kongenitale Hirnläsionen, welche assoziiert mit den angeborenen Herzfehlern vorkamen. A. Ulegyrie mit Hirnatrophie, B. Kortikale Entwicklungsretardierung im Großflächenschnitt in Form von säulenartig angeordneten Areale bei einem reifen Kind (HE, x4). C. Hydrocephalus internus vacuo wird häufig bei Kindern mit angeborenen zaynotischen Herzfehlern beobachtet. D. Zentral gelegene Leptomeningeale neuronale Heterotopie im Subarachnoidalraum (HE10x).....	24
Abbildung 2.4.1: : Ergebnisse der Hamburg-Wechsler Intelligenztest (HAWIK III) bei Kindern nach Korrektur einer Fallot'schen Tetralogie (schwaze Balken) mit Hilfe der extrakorporalen Zirkulation im Vergleich zu gleichaltrigen Kontroll-kindern nach inter-ventionellem Verschluß eines Vorhofseptum-defektes mit Amplatzer Septaloccluder. Signifikante verminderte Werte bei den Kindern mit der Fallot'schen Tetralogie fanden sich im Handlungs-IQ und Minderung in der Wahrnehmungsorganisation	26
Abbildung 3.1.1.: Veränderung der mittleren Flussgeschwindig-keit (Vm) und des Pulsatilitätsindex (PI) in der A. cerebri media (ACM) in den 3 untersuchten Gruppen. Im Gegensatz zu der Gruppe mit normothermer Perfusion, fielen die Vm-Werte nach Anschluss an die EKZ und Abklemmung der Aorta in der Gruppe mit moderater und tiefer Hypothermie signifikant ab. Der PI war in der hypothermen Gruppe im Vergleich zu der normothermen Gruppe signifikant erhöht. Die Flussrate der EKZ (ml/kg/min) war in der hypothermen Gruppe niedriger als in den anderen Gruppen.....	29
Abbildung 3.1.2: Retrograder diastolischer Flussmuster in der Arteria cerebri media bei einem Neugeborenen nach einer Phase von Kreislaufstillstand in tiefer Hypothermie im Vergleich mit einem gleichaltrigen Neugeborenen nach hypothermer Perfusion ohne Kreislaufstillstand.....	31
Abbildung 3.2.1: Zerebrale Flussgeschwindigkeiten in der Arteria cerebri anterior (ACA) bei Kindern vor und nach Korrekturoperationen. Das Flussmuster, welches durch das	

errechnete Integral der Fläche unter der Flusskurve (FVI= Flow Velocity Intergral) in der Art. cerebri anterior dargestellt ist, war während der ersten postoperativen Stunden in allen Gruppen signifikant reduziert. Die zerebralen Flussgeschwindigkeiten normalisierten sich zu den präoperativen Werten 24 Stunden nach Ende der Operation.....	32
Abbildung 3.2.2.: Veränderung des zerebralen Flussmusters (Flow Velocity Intergrtal FVI) in der Arteria cerebri anterior (ACA) und carotis interna (ICA) bei den Neugeborenen mit und ohne intraventrikulären Hämorrhagien (IVH) nach Swichoperationen. Die initialen postoperativen FVI-Werte waren signifikant höher in der Gruppe mit IVH (3.2.2 A). In der Gruppe mit IVH fiel der Resistanzindex (RI) während der ersten 8 Stunden postoperativ signifikant ab und stieg 48 Stunden nach der Operation erneut an (3.2.2 A). Diese Veränderung in dem RI war durch Schwankungen in der enddiastolischen Flussgeschwindigkeit bedingt (Abb. 3.2.2.B).....	34
Abbildung 4.1.1.: Röntgenbild der Schädelbasis sowie der oberen Halswirbelsäule eines Kindes mit Darstellung des retrograd positionierten Oxymetrie-Katheters im Bulbus der Vena jugularis interna (Pfeil) und Position des NIRS-Sensors an der gleichen Schädelseite. (light source = Lichtquelle, superficial receiver = oberflächige Empfängeroptode, deep receiver = Tiefenempfänger).	36
Abbildung 4.1.2: Es zeigte sich eine enge Korrelation zwischen der Messungen der regionalen zerebralen Hämoglobinsättigung (rSO ₂) mit NIRS rechts frontotemporal und der simultan oxymetrisch bestimmten zerebralvenösen Hämoglobinsättigung im Bulbus der Vena jugularis interna rechts (SjO ₂).....	37
Abbildung 4.1.3: Veränderungen in der zerebralen regionalen Hämoglobinsättigung (rSO ₂) bei den operierten Kindern, gegliedert in Altersgruppen, während der unterschiedlichen Phasen der extrakorporalen Zirkulation (EKZ) (Mittelwerte±SE)	38
Abbildung 4.1.4: Die rSO ₂ - Trendwerte vor und nach modifizierter Ultra-filtration (MUF). Die rSO ₂ -Werte in der Gruppe mit MUF unterschieden sich nicht signifikant von denen ohne MUF. Die MUF scheint keinen unmittel-baren EinFluss auf die Veränderung in der rSO ₂ nach standardisierten Operationen mit Hilfe der EKZ zu haben.	40
Abbildung 4.2.1.: Verlauf der regio-nalen zerebralen Hämoglobinsättigung (rSO ₂) und der simultan erfaßten hämodynamischen Parameter während der postoperativen Phase. Die rSO ₂ -Werte waren während der initialen Phase nach EKZ im Vergleich mit den präoperativen Werten signifikant erniedrigt und stiegen während der ersten 24 Stunden signifikant an. Ein Zusammen-hang zu den hämo-dynamischen Para-metern fand sich nur zu der zentral-venösen Sättigung (ZVS).	41
Abbildung 4.2.2: Total Hämoglobin repräsentiert die Summe des intravaskulären oxygenierten (HbO ₂) und de-oxygenierten Hämoglobins (deoxy.Hb) und korreliert mit dem hämodynamischen regionalen zerebralen Blutvolumen. Während der gesamten intraoperativen Überwachung zeigte sich ein enger Zusammenhang zwischen den Veränderungen in Total Hämoglobin und den beiden Formen des Oxygenierten und deoxygenierten Hämoglobins.....	44
Abbildung 4.2.3: Zusammenhang zwischen dem total Hämoglobin (tHb) und der mitochondrialen Cytochromoxydase aa3 (Cyt.Ox aa3) während der extrakorporalen Zirkulation. Die meisten gemessenen Werte der Cyt.Ox aa3 wurden in einem kleinem Bereich zwischen -2 und +2 µmol/L gemessen. Die Werte des tHb zeigten jedoch größere Schwankungen als der von der Cyt.Ox aa3 (A). Die Werte der in dem Bereich zwischen -2 und +2 korrelierten nicht mit den simultan gemessenen Werten des HbO ₂ zwischen 60 und 230 µmol/L. (A). Abweichungen in den Werten der Cyt.Ox aa3 außerhalb dieses Bereiches zeigten jedoch einen Zusammenhag zu den Veränderungen in den intravaskulären Oxygenationsparametern (B).....	44

Abbildung 5.1.1: : Serum Konzentrationen des Proteins S-100B (Mittelwerte \pm SE) bei Kindern ohne neurologische oder kardiorespiratorische Komplikationen vor und nach Korrekturoperationen verschiedener Herzfehler mit Hilfe der extrakorporalen Zirkulation (EKZ) im Vergleich mit einer Kontrollgruppe mit einer Aortenisthmusstenose (ISTA) ohne EKZ. Bei allen Gruppen, mit Ausnahme der Säuglinge mit ISTA, stieg das S-100B nach der Operation signifikant an. Die Serum Konzentrationen waren sowohl vor als auch nach der Operation alters- und gewichtsabhängig. Die höchsten postoperativen Serumkonzentrationen wurden bei den Neugeborenen und Säuglingen nach Korrekturoperationen komplexer Vitien wie das d-TGA und das HLHS mit Hilfe hypothermer EKZ gemessen.	48
Abbildung 5.1.2: Im Vergleich mit allen Kinder ohne Komplikationen waren die postoperativen S-100B-Werte bei Kindern mit neuro-logischen oder hämodynamischen Komplika-tionen jenseits der unmittelbaren 2 Stunden nach der EKZ weiterhin abnorm erhöht	49
Abbildung 5.3.1: Serumkonzentrationen des astroglialen Proteins S-100B und der simultan gemessenen Konzentrationen des Malondialdehydes (MDA) im Serum während verschiedener Phasen der extrakorporalen Zirkulation (EKZ). Der gleichzeitige Anstieg des Lipidperoxidation-endproduktes MDA und des Proteins S-100B in der Reperfusionsphase weist auf eine O ₂ -Radikalinduzierte Zellmembranschädigung der Astrozyten auf zerebraler Ebene hin.....	52
Abbildung 5.4.1: Die kontinuierliche Behandlung mit niedrig konzentrierter Infusion Natrium Nitroprussid (SNP) (1-5 μ g/kg/min) scheint die Freisetzung des Proteins S-100B aus den Astrozyten zu hemmen. Eine protektiver Effekt an den Astrozyten-Endothelzellkomplex der Blut-Hirnschranke ist anzunehmen.....	55
Abbildung 5.5.1: Die Serumkonzentrationen des Proteins S-100B vor und nach der modifizierten Ultrafiltration (MUF). Die späteren Serumkonzentration 24 Stunden nach der EKZ waren bei den Kindern mit MUF signifikant niedriger.	56
Abbildung 5.5.1: : Versuchsaufbau in der tierexperimentellen Einrichtung der Charite	57
Abbildung 6.1.1: Zeitlicher Verlauf der unterschiedlichen Phasen der experimentellen EKZ in Abängigkeit von der Temperatur. Während des gesamten Versuchs erfolgt ein Neuromonitoring mit Hilfe der Nahinfrarot Spektroskopie (NIRS), der transkraniellen Dopplersonographie und der Mikrosphärenmethode zur Evaluierung der regionalen Hirnperfusion während der EKZ. Blutproben zur Bestimmung biochemischer Marker werden zu definierten Zeitpunkten abgenommen	59
Abbildung 7.1.1:.....	64
Abbildung 7.1.2: Immunhistochemische Färbung der Astrozyten (A) im Hippocampus. Das Protein S-100B ist rot in den Atsrozyten und ihren Fortsätzen rot gefärbt (Pfeil). Die topographische Beziehung zwischen den Astrozyten und den Kapillaren könnte den Mechanismus der Freisetzung des S-100B aus den Astrozyten in die Blutbahn zum Teil erklären.	65
Abbildung 7.4.1: : Morphologische Veränderung in den Neuronen der CA1- Region des Hippocampus bei einem Tier nach 60 bzw. 120 Minuten in tief hypothermem Kreislaufstillstand (THKS). Nach verlängertem Kreislaufstillstand von 120 Minuten ist hypoxisch bedingte nekrotische Zelltod lichtmikroskopisch, charakterisiert durch Eosinophilie des Zytoplasmas, Zellschrumpfung und Kernveränderungen, deutlich in den meisten Neuronen sichtbar.	70
Abbildung 7.4.2: Veränderungsmuster in den intravaskulären zerebralen Oxygenationsparametern des oxygen. (HbO ₂) und deoxyg. Hämoglobins (deoxy.Hb), der regionalen Hämoglobinsättigung (rSO ₂) sowie der intrazellulären Cytochromoxydase aa3 (Cyt.Ox.aa3). Eine charakteristische Veränderung vom	

Ausgangswert wurde entsprechend der Hypothermie und Unterbrechung der Zirkulation während des tief hypothermen Kreislaufstillstandes (THKS) gefunden.....	71
Abbildung 7.4.3: Veränderung der regionalen Hirnperfusion während und nach hypothermer Perfusion. In allen Hirnregionen war ein signifikanter Abfall der Hirnperfusion während der Hypothermie festzustellen ($p < 0,01$).....	72
Abbildung 7.4.4: Serumkonzentrationen des Proteins S-100B vor, während, und nach 60 bzw. 120 minütigem tief hypothermen Kreislaufstillstand (THKS).....	73
Abbildung 7.4.5: : Serumkonzentrationen des Proteins S-100B bei den Tieren mit und ohne Komplikationen vor der systemischen Kühlung (a). Der unmittelbar signifikante Anstieg des Proteins S-100B im Serum bei den Tieren mit hämodynamischen Komplikationen war mit einer positiven Extravasation des Farbstoffes Evans-Blue im Cortex assoziiert (b). Abnorm hohe Serumkonzentrationen des S-100B im Serum weisen auf eine Öffnung der Bluthirnschranke hin.....	74
Abbildung 7.4.6: : Die Serumkonzentration des Proteins S-100B in Anhängigkeit mit der hypoxisch-ischämischen neuronalen Zellschädigung in der Region CA4 des Hippocampus.	75
Abbildung 7.4.7: : Immunhistochemische Färbung des S-100B in einem Kontrolltier mit einer Scheinoperation und einem Tier nach extrakorporaler Zirkulation und tief hypothermem Kreislaufstillstand.....	76
Abbildung 7.4.8: Kinetik des Astrogliazellproteins S-100B und der Neurospezifischen Enolase (NSE) im Serum während und nach der EKZ mit einer Stillstandsphase in tiefer Hypothermie. Im Gegensatz zur NSE waren die Serumkonzentrationen des Proteins S-100 bereits nach dem Anschluß an der EKZ und dem Beginn der Kühlung signifikant angestiegen. Die höchsten Werte wurden in der Reperfusionsphase nach dem tief hypothermen Kreislaufstillstand gemessen. Die Serumwerte der NSE stiegen in dieser Phase ebenfalls signifikant an, blieben jedoch signifikant niedriger als die Ausgangswerte.....	77
Abbildung 7.4.9: Die Konzentrationen der Ca^{++} -bindenden Proteinen und der neurospezifischen Enolase (NSE) im Liquor waren in allen Tieren nach der EKZ mit dem verlängertem Kreislaufstillstand in tiefer Hypothermie im Vergleich zu den Ausgangswerten massiv angestiegen. Der massive Anstieg der astrozytären und neuronalen Marker weist auf eine signifikante Hirnzellschädigung hin. Das Missverhältniss zwischen den Konzentrationen im Serum und im Liquor zeigt eine limitierte Durchlässigkeit dieser Marker in die Blutbahn, möglicherweise durch eine intakte Blut-Hirnschranke.	78
Abbildung 7.4.10: Immunhistochemische Färbung von neuronalen Ca^{++} -bindenden Proteinen in einigen Subpopulationen gut erhaltener Neurone 10x und 40x. Calretinin kommt im Kerngebiet hemmender Neurone vor. Zusätzlich zur Immunfärbung des Zytoplasmas (braune Zellen) waren auch die Axonen dieser Neurone mit Calretinin positiv angefärbt. Die Immunfärbung der Neurospezifischen Enolase (NSE) und des Parvalbumins in intakten Neuronen ist als Rot gut darstellbar. In den Schnitten mit der NSE und Parvalbuminfärbung sind einige Astrozyten geschwollen dargestellt (Pfeil e)	79
Abbildung 8.1.1: Der prozentuale Anteil der regionalen Hirnperfusion (ml/g/min) vom Ausgangswert nach einer hypothermen Kreislaufstillstandsphase von 120 Minuten. Die regionale Hirnperfusion war bei den intrathekal behandelten Tieren höher als bei den Kontroll- und den systemisch behandelten Tieren.	82
Abbildung 8.1.2: Die mittlere Flussgeschwindigkeit (V_m) in der A. cerebri media vor, während und nach dem Experiment. Die mittlere zerebrale Flussgeschwindigkeit fiel nach systemischer Kühlung in allen Gruppen signifikant ab. Vor und nach dem	

tiefhypothermen Kreislaufstillstand war die Vm in den intrathecal vorbehandelten Tieren signifikant höher als bei den Kontrolltieren.	82
Abbildung 8.1.3: : Zerebrale Oxy-genationsparamter gemessen mit der Nahinfrarot Spektroskopie (NIRS) in den Kontrolltieren und in den sytemisch und intrathekal mit Methylprednisolon (MP) vorbehandelten Tieren. Die intravaskuläre und intrazelluläre Oxygenation in der systemisch vorbehandelten Gruppe fiel während und nach dem tief hypothermen Kreislaufstillstand (THKS) signifikant tiefer ab als bei der Kontroll- und Intrathekalgruppe. Fehler! Textmarke nicht definiert.	
Abbildung 8.1.4: Liquorkonzentrationen des Proteins S-100B in der systemisch und intrathekal mit Methylprednisolon vorbehandelten Gruppe im Vergleich mit der Kontrollgruppe vor und nach der tiefhypothermen Kreislaufstillstandsphase (THKS) von 120 Minuten. Die Konzentration des S-100B im Liquor war signifikant niedriger in den intrathekal vorbehandelten Tieren.	84
Abbildung 8.1.5: : Glukosewerte im Blut in der systemisch und intrathekal mit Methylprednisolon vorbehandelten Gruppe im Vergleich mit der Kontrollgruppe vor und nach der tiefhypothermen Kreislauf-stillstandsphase (THKS) von 120 Minuten. Hyperglykämie trat in den beiden mit Methylprednisolon vorbehandelten Gruppen auf, diese persistierte jedoch stärker in der Gruppe mit systemischer Steroid-vorbehandlung.	85
Abbildung 8.1.6: : Die quantitativen neuropathologischen Veränderungen in Hippocampus-regionen bei den mit Methyl-prednisolon vorbehandelten Tieren. Die intrathekale und nicht die sytemische Vorbehandlung mit MP scheint einen neuroprotektiven Effekt nach einer hypothermen Kreislaufstillstandsphase von 120 Minuten im Hippocampus zu entfalten.	86
Abbildung 8.1.7: Paraffinschnitt in CA4 zeigt eine signifikante Reduktion der hypoxisch nekrotischen Neuronen in CA4 des Hippocampus. Der hypoxisch bedingte nekrotische Zelltod ist lichtmikroskopisch charakterisiert durch Eosinophilie des Zytoplasmas, Zellschrumpfung und Kernveränderungen in Form von Kernpyknose und Kernbasophilie (Pfeil). Perivaskuläres und perineurales Ödem wurde in allen Tieren mit und ohne Vorbehandlung gleichermaßen beobachtet (e Pfeil).	86
Abbildung 8.1.8: Anteil apoptotischer Neurone im Gyrus dentatus bei den Methylprednisolon vorbehandelten Tieren und bei den Kontrolltieren. Apoptotischer Zelltod trat überwiegend im Gyrus dentatus des Hippocampus in signifikant höhes Zahl auf, sowohl nach systemischer als auch nach intrathekaler Vorbehandlung	87
Abbildung 8.1.9 Die Apoptose fand sich überwiegend regional im Gyrus dentatus des Hippocampus. Ein Paraffinschnitt des Gyrus dentatus zeigt lichtmikroskopisch neben den normalen (Pfeil n), und den hypoxisch nekrotischen Neuronen (Pfeil), apoptotische Neurone charakterisiert durch Kondensation des nuklearen Chromations by gleichzeitiger Erhaltung des Zellkörpers (Pfeilkopf). Haematoxylin und Eosin (HE, 40X).	87
Abbildung 8.1.10: Die Apoptose in den Neuronen wurde ebenfalls nach der TUNEL-Methode (terminal transferase-mediated dUTP-digoxigenin nick end-labeling) gefärbt und bestätigt. Der fragmentierte DNA-Kerninhalt erscheint als dunkle Chromatin-Körperchen oder apoptotic bodies	88
Abbildung 8.1.11: Die Morphologie der Apoptose wurde zusätzlich in Semi-Dünnschnitten beurteilt und bestätigt. Die apoptotischen Neurone zeigten Zellschrumpfung unter Erhalt der Zellmembran, mit charakteristischen Kernveränderungen in Form von Heterochromatisation bzw. Kondensation des Kerninhalts (DNA-Fragmentation) (Pfeilkopf). Im Vergleich ist daneben ein gut erhaltener benachbarter Neuron zu sehen (Pfeil n).	88
Abbildung 8.2.1:	89

Abbildung 8.2.2:.....	91
Abbildung 8.2.3: Die mittlere Flussgeschwindigkeit (Vm) in der A. cerebri media vor, während und nach dem Experiment. Die mittlere zerebrale Flussgeschwindigkeit fiel nach systemischer Kühlung in allen Gruppen signifikant ab. Nach dem tief-hypothermen Kreislaufstillstand war die Vm in den mit Cyclosporin vorbehandelten Tieren signifikant niedriger als bei den Kontrolltieren.	93
Abbildung 8.2.4: Zerebrale Oxygenationsparamter gemessen mit der Nahinfrarot Spektroskopie (NIRS) in den Kontrolltieren und in den mit Cyclosporin und FK506 vorbehandelten Tieren. Die intrazelluläre Oxygenation in der Cyclosporin- und FK506 vorbehandelten Gruppe fiel während und nach dem tief hypothermen Kreislaufstillstand (THKS) signifikant weniger ab als bei der Kontrollgruppe.	93
Abbildung 8.2.5: Liquorkonzentrationen des Proteins S-100B in den mit cyclosporin und FK506 vorbehandelten Tieren im Vergleich mit den Kontrolltieren ohne Behandlung vor und nach der tiefhypothermen Kreislaufstillstandsphase (THKS) von 120 Minuten. Die Konzentration des S-100B im Liquor war signifikant niedriger in den mit Cyclosporin vorbehandelten Tieren	94
. Abbildung 8.2.6: : Anteil apoptotischer Neurone im Gyrus dentatus bei den mit Cyclosporin, FK506 vorbehandelten Tieren und Kontrolltieren. Apoptotischer Zelltod trat überwiegend im Gyrus dentatus des Hippocampus in signifikant höherer Zahl in den mit FK506 vorbehandelten Tieren auf. Die Zahl der apoptotischen Neuronen war bei den mit Cyclosporin vorbehandelten Tieren nicht signifikant angestiegen.....	95
Abbildung 8.2.7: : Die quantitativen neuropathologischen Veränderungen in den Hippocampusregionen bei den mit FK506 und Cyclosporin-vorbehandelten Tieren. Beide Immunsuprisiva scheinen histologisch einen protektiven Effekt im Gehirn nach einem verlängerten Kreislaufstillstand in tiefer Hypothermie zu entfalten. Die Verminderung der Zahl der hypoxischen Neuronen war nach Cyclosporinvorbehandlung im Hippo-campus noch ausgeprägter.	95
Abbildung 9.1.1: 2 Modus der neuronalen Zellschädigung in Autopsien von Kindern nach Herzoperationen mit der extrakorporalen Zirkulation. A. Hypoxisch geschädigte Neurone im Thalamus HE x10, B. Subikuläre Apoptose und perineuronales Ödem HE 20x, C. Apoptose im Subiculum TUNEL x10,	99
Abbildung 9.3.1: . Bettnahes nicht-invasives Neuromoni-toring der zerebralen Oxygenation mit Hilfe der nahinfrarot Spektroskopie und perfusion mit Hilfe der transkraniellen Dopplersonographie, bei einem Kind nach einer Herzoperation auf der Intensivstation	104
Abbildung 9.4.1: Die Abbildung zeigt die topographische Beziehung zwischen Kapillaren, Astrozyten und Neuronen. Dies unterstreicht die enge funktionelle Beziehung zwischen diesen Hirnzellstrukturen.....	107

Tabellenverzeichnis

Tabelle 3.1.1: Einflussfaktoren auf die zerebrale Perfusion.....	30
Tabelle 3.2.1: : Klinische Daten der untersuchten Kinder (Mean, Range).....	32
Tabelle 3.2.2: Klinische Daten der Kinder mit und ohne intraventrikuläre Hemorrhagien (IVH).....	33
Tabelle 5.1.1:.....	47
Tabelle 5.2.1: Demographische Daten	50
Tabelle 5.3.1:.....	53

1. Einleitung:

1.1.

Die Mortalität bei Kindern mit angeborenen Herzfehlern ist durch verbesserte Frühdiagnostik und kardiochirurgische Therapie in den letzten Jahren drastisch gesunken. Die erhöhte Überlebensrate lenkt das Interesse zunehmend auf die Lebensqualität dieser Kinder und insbesondere auf das neurologische und psychomotorische Spätresultat nach Korrekturoperationen im Kleinkindesalter¹⁻⁹. Zerebrale Schädigungen nach herzchirurgischen Operationen mit Hilfe der extrakorporalen Zirkulation (EKZ) mit und ohne tiefhypothermem Kreislaufstillstand sind die wichtigsten Komplikationen sowohl bei Kindern als auch bei Erwachsenen geworden^{7,10-17}. Hirnschädigungen im Zusammenhang mit angeborenen Herzfehlern sind seit längerer Zeit bekannt¹⁸. Die ersten Befunde wurden in Autopsie-Studien verstorbener Patienten mit zyanotischen Vitien in Form von septischen Embolien, Infarkten oder durch chronische Zyanose bedingte Hirnatrophie berichtet¹⁸⁻²⁰. Das Schädigungsmuster im Gehirn bei Kindern mit angeborenen Herzfehlern hat sich jedoch seit der Einführung der extrakorporalen Zirkulation und Ermöglichung von Korrekturoperationen im frühen Kindesalter verändert²¹⁻²⁵. Seit der Einführung der EKZ mit und ohne tiefhypothermem Kreislaufstillstand ist die Mortalität stark zurückgegangen und bei den überlebenden dominieren andere neurologische Manifestationen im späteren Verlauf, wie psychomotorische Veränderungen, kognitive Leistungsminderung und Beeinträchtigung der Feinmotorik^{1,2,4,5,8,26}. Follow-up-Studien zeigten eine signifikante Beeinträchtigung der psychomotorischen Entwicklung nach Switch-Operationen bei Neugeborenen mit d-Transposition der großen Arterien (d-TGA)¹⁻⁵. Diese Veränderungen traten signifikant häufiger bei Kindern, die einer tiefhypothermen Kreislaufstillstandsphase unterzogen wurden, als bei solchen, die mit Hilfe der EKZ mit niedrigem Fluss operiert wurden ohne Kreislaufstillstand, auf^{1,2,9}.

Der Pathomechanismus dieser neurologischen Morbidität und die Beeinträchtigung der psychomotorischen Entwicklung nach herzchirurgischen Eingriffen bei Kindern scheint multifaktoriell zu sein und überwiegend auf globalen oder fokalen hypoxisch-ischämischen Ereignissen *vor, während und nach* der extrakorporalen Zirkulation zu beruhen^{7,21,22,24,27-30}.

Pränatal nicht diagnostizierte Ductus-abhängige Vitien können unmittelbar postnatal unauffällig verlaufen und erst Tage später nach Verschluß des Ductus zu einer abrupten systemischen Hypoxie führen. Komplexe Malformationen des Herzens und der Gefäße könnten auch mit einer kongenitalen Malformation des Zentralnervensystems einhergehen³⁰⁻³². Bei den angeborenen

Vitien mit rechts-links Shunt können venöse Thromben ungehindert in den Systemkreislauf gelangen und leicht in die zerebralen Gefäße ausgeschwemmt werden ⁶. Neben den bekannten chromosomalen Anomalien wie Trisomie 21, Catch 22, bleiben vermutlich andere latente kongenital assoziierte Anomalien im Zentralnervensystem aufgrund mangelnder neuropathologischer Untersuchungen in Autopsien bei an kongenitalen Vitien verstorbenen Kindern unerkant ³²⁻³⁴.

Der Pathomechanismus neurologischer Störungen während der Korrektur angeborener Herzfehler, welcher im direkten Zusammenhang mit dem Anschluß an die EKZ steht, ist komplex und wahrscheinlich von vielen hämodynamischen Faktoren abhängig wie Perfusionsrate, Grad der Hämodilution, Hypothermie und Dynamik der Kühlung und Erwärmung, regionaler Genexpression, Dauer der Kreislaufunterbrechung sowie dem Alter und dem Gewicht der Kinder ^{25, 13,30,35-39}. Der Kontakt des Blutes mit einer großen künstlichen nicht-physiologischen Oberfläche im Oxygenator und im Schlauchsystem der EKZ löst eine Kaskade von inflammatorischen Prozessen aus, einschließlich der Bildung von Sauerstoffradikalen und Störungen des Gerinnungssystems ^{40, 41-44}. Die Reaktion der verschiedenen Organe und Zellverbände ist unterschiedlich und vom Ausmaß der Abweichung in den o.g physiologischen Parametern während der Korrekturoperation abhängig.

Die Hirnzellen reagieren möglicherweise aufgrund ihrer verschiedenen funktionellen, strukturellen, topographischen und regionalen Eigenschaften unterschiedlich auf die extremen physiologischen Schwankungen durch die EKZ ^{27,35,43,45-47}.

Das Ziel der klinischen Untersuchungen in dieser Arbeit war daher, hirmorphologische Veränderungen während und nach Korrekturoperationen angeborener Herzfehler zu untersuchen: anhand bildgebender Verfahren, durch Bestimmung von biochemischen Hirnzellmarkern sowie Messung der zerebralen Perfusion und Oxygenation mit Hilfe verfügbarer nicht-invasiver Methoden wie der transkraniellen Dopplersonographie und Nahinfrarot-Spektroskopie. Die tierexperimentellen Untersuchungen dienten der Erfassung neuropathologischer Veränderungen unter Einbeziehung der klinisch angewandten Methoden und der Evaluierung neuroprotektiver Strategien zur Milderung der Hirnzellschädigung.

1.2. Neuroprotektion während herzchirurgischer Eingriffe.

Mehrere hämodynamische und pharmakologische Maßnahmen wurden in den letzten 10 Jahren anhand klinischer und tierexperimenteller Untersuchungen erprobt, die aber den erhofften Durchbruch zur Minimierung neuronaler Schädigungen nach herzchirurgischen Operationen nicht erbrachten ^{31,38,39,48-54}.

1.2.1. intraoperative Hypothermie

Die metabolische Rate für den Sauerstoffumsatz im Gehirn wird während tiefer Hypothermie auf ein Niveau von ca. 20% des Ausgangswertes gesenkt und die Ischämietoleranz damit erhöht ⁵⁵⁻⁶⁰. Ein noch aktiver neuronaler Restmetabolismus stellt jedoch ein Risiko während der hypothermen Ischämie dar. Hinweise auf zusätzliche Schädigungen durch die Hypothermie in den kleinen zerebralen Gefäßen wurden gesucht ⁶¹. Der neuroprotektive Effekt der Hypothermie bedarf daher weiterhin einer genaueren Prüfung und einer kritischen Anwendung.

1.2.2. Regulation des Säure-Basen-Haushaltes

Widersprüchliche Angaben wurden in der Literatur hinsichtlich der Neuroprotektion durch Modifikation des pH-Status und des pCO₂ im Blut während hypothermer EKZ berichtet ^{54,62-66}. Bei der *alpha-stat-Methode* wird durch Verschiebung der CO₂-Bindungskurve bei absinkender Temperatur eine Alkalisierung des bereits azidotischen intrazellulären Raumes erreicht ³⁹. Als ein positiver Effekt der *pH-stat-Methode* wird hingegen eine Vasodilatation der kleinen Arteriolen während der Kühlung und in der Erwärmungsphase vermutet und damit eine Verbesserung der zerebralen Hämodynamik nach hypothermer Ischämie ^{53,54,64,67}. Eine entscheidende Verbesserung im Sinne einer neuroprotektiven Strategie ließ sich jedoch allein durch Veränderung des Säurebasen-Haushaltes nicht erreichen ^{68,6}. Ein protektiver Effekt ließe sich möglicherweise durch Kombination beider Methoden, nämlich dem Einsatz der *alpha-stat-Methode* während der Kühlung und der *pH-stat-Methode* während der Erwärmung erzielen. Klinische oder experimentelle Daten diesbezüglich sind nicht vorhanden.

1.2.3. Retrograde zerebrale Perfusion

Bei Erwachsenen wird der Kreislaufstillstand in tiefer Hypothermie bei Korrekturoperationen am Aortenbogen und bei Aneurysmen und Dissektionen der Aorta angewandt. Auch in dieser Altersgruppe stellt der Kreislaufstillstand in tiefer Hypothermie das höchste Risiko für die Entwicklung neuropsychomotorischer Komplikationen in der postoperativen Phase dar ^{69,70}. Die

selektive antegrade Perfusion des Gehirns wird aufgrund der invasiven Kannülierung der Halsarterien und des Risikos einer Gefäßverletzung nicht häufig angewandt ⁷¹. Über die liegenden Kanülen in der oberen Hohlvene wird eine retrograde Perfusion des Gehirns mit hypothermem oxygenierten Perfusat durchgeführt ^{72,73}. Die Ergebnisse hinsichtlich der Neuroprotektion sind hierbei allerdings kontrovers ^{70,72-76}. Ye et al zeigten in einer experimentellen Untersuchung eine inhomogene Perfusion des Gehirns durch retrograde Perfusion ohne einen protektiven Effekt gegen die hypoxische Ischämie ⁷⁷. Abgesehen davon ist diese Methode aufgrund der Größe der Halsgefäße bei Kindern im Neugeborenenalter kaum durchführbar.

1.2.4. Modifizierte Ultrafiltration

Die Ultrafiltration von Flüssigkeit aus dem Kreislauf nach Ende der Operation stellt eine einfache Methode zur negativen Bilanzierung der Patienten bei eingeschränkter kardialer und renaler Leistung unmittelbar nach Ende der EKZ dar ^{78,79}. Im Tiermodell wurde die zerebral-metabolische Rate für Sauerstoff durch MUF signifikant verbessert ⁸⁰. In einer anderen experimentellen Untersuchung wurde keine signifikante Verbesserung der zerebralen intrazellulären Oxygenation oder der histologischen Veränderungen im Gehirn durch MUF erreicht ⁸¹. Es bleibt unklar, ob und inwieweit sich diese Maßnahme auf die zerebrale Oxygenation und Perfusion nach Korrekturoperationen im klinischen Alltag positiv auswirkt.

1.2.5. Pulsatiler und nicht-pulsatiler Bypassfluss

Obwohl beide Flussformen keinen wesentlichen Einfluss auf die zerebralen Perfusionsvolumina haben ⁸²⁻⁸⁵, wurden einige Vorteile hinsichtlich der Reduktion, der Gewebeazidose ^{23,86}, der inflammatorischen Antwort und der Verbesserung der Mikrozirkulation in allen Organen bei Anwendung des pulsatilen Flusses gefunden ^{82,87}. Vergleichende klinische Studien bei Kindern hinsichtlich eines möglicherweise neuroprotektiven Effekts durch pulsatilen Fluss während der EKZ fehlen dagegen.

1.2.6. Postoperative moderate Hypothermie

In mehreren tierexperimentellen Studien scheint die moderate Hypothermie nach einer transienten Ischämie einen protektiven Effekt im Gehirn zu zeigen ⁸⁸⁻⁹⁰. Auch nach normothermer EKZ und Kreislaufstillstand in tiefer Hypothermie wurde eine Verbesserung der zerebralen Oxygenation und Verringerung der neuropathologischen Veränderungen bei neugeborenen Schweinen beobachtet ^{30,91 92}.

1.2.7. Pharmakologische Intervention durch Gabe von neurospezifischen protektiven Substanzen

Zusätzlich zur Modifikation der hämodynamischen Parameter wurden verschiedene Pharmaka eingesetzt, um die zerebrale Ischämie zu vermindern. Steroide werden seit längerer Zeit in der Herzchirurgie ohne nachweisbaren protektiven Effekt auf zerebraler Ebene als antiinflammatorisch und als Prophylaxe gegen das Ödem eingesetzt und weiterempfohlen^{93, 6}. In verschiedenen experimentellen Arbeiten zur EKZ mit tiefhypothermem Kreislaufstillstand wurde die Blockierung von bestimmten Prozessen in der biochemischen und inflammatorischen Kaskade nach Ischämie und Reperfusion untersucht, wie die Blockade des Selektin-Adhesionmoleküls⁹⁴, des Thromboxane-A₂-Rezeptors⁹⁵, des NMDA-Rezeptors⁹⁶ und die Antagonisierung der Glutamattransmission im Zentralnervensystem⁹⁷. Protamin (Aprotinin), welcher zur Neutralisierung des Heparins nach Ende der EKZ verabreicht wird, scheint durch protektive Mechanismen im Endothel die Erholung der zerebralen metabolischen Rate nach dem tiefhypothermen Kreislaufstillstand zu fördern⁹⁸. Der Einsatz von Antioxidantein (Alloporinol, Vit E) während herzchirurgischer Eingriffe mit Hilfe der EKZ scheint die oxidative Schädigung im Gewebe zu lindern^{99,100}.

Pharmakologische Interventionen, die mit Modulation der NO-Synthese und eines resultierenden vasodilatativen Effekts im zerebrovaskulären Bereich einhergehen, könnten die Erholung des zerebralen Metabolismus nach tiefhypothermen Kreislaufstillstand positiv beeinflussen¹⁰¹.

2. Hirnschädigung nach chirurgischer Behandlung angeborener Herzfehler

2.1. *Abnorme ultrasonographische Befunde nach Korrekturoperationen angeborener Herzfehler in der neonatalen Periode.*

Serielle prospektive Ultraschalluntersuchungen bei Neugeborenen vor und nach Korrekturoperationen zeigte das Auftreten intraventrikulärer Blutungen unterschiedlicher Ausprägung im Zusammenhang mit der EKZ und hypothermer Perfusion. In einer homogenen Gruppe von 225 Neugeborenen mit d-Transposition der großen Arterien, die einer Switschoperation zwischen 1988 und 2001 unterzogen wurden, trat eine intraventrikuläre Blutung (Grad I-IV) bei 19 (8,4%) Neugeborenen auf. Die Einteilung des Schweregrades erfolgte nach der Klassifikation von Papile et al wie folgt: Grad I (n=8), Grad II (n=6), Grad III (n=2), Grade IV (n=2).

Auffällig häufig war diese eher Frühgeborenen-typische neurologische Komplikation bei Reifneugeborenen nach Korrektur komplexer Vitien im neonatalen Alter ebenfalls zu beobachten. Obwohl die meisten sonographischen Veränderungen spätestens 2 Wochen nach der Operation wieder verschwanden, zeigte sich hiermit doch eine erhöhte Empfindlichkeit der Gefäße im Plexus choroideus gegenüber abnormer physiologischer Veränderungen, wie sie unter EKZ auftreten.

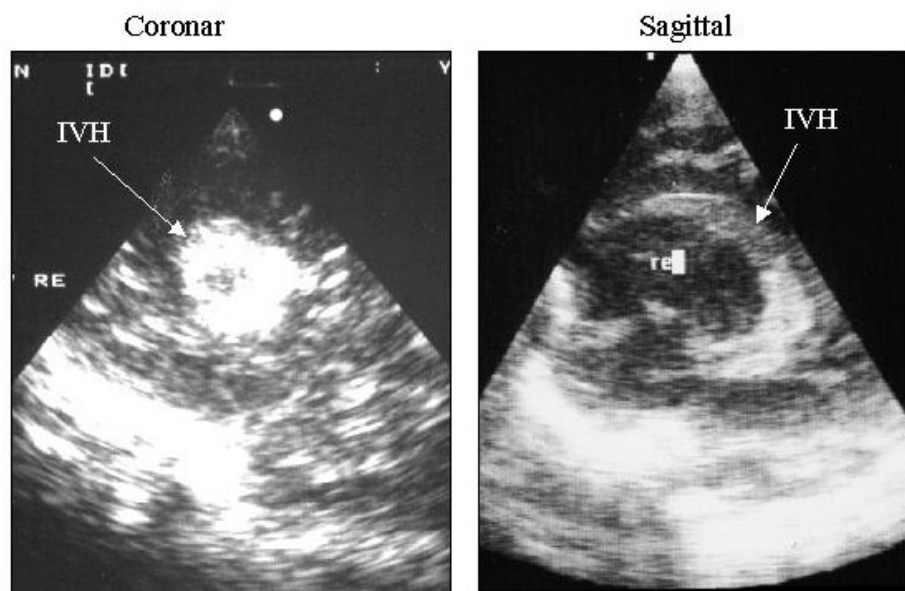


Abbildung 2.1.1: Schädelultraschall zeigt eine intraventrikuläre Blutung Grad III (IVH III) im Seitenventrikel, welche den gesamten Ventrikel-raum füllt, bei einem 11 Tage alten Neugeborenen mit d-TGA nach Switschoperation

2.1.1. Hirnparenchymatöse Blutung

Periventrikuläre Blutungen traten nur selten nach herzchirurgischen Eingriffen auf. Einzelne Fälle wurden jedoch im Zusammenhang mit postnatal verkannten Ductus-abhängigen Vitien nach Entlassung der Kinder und folgendem Ductusverschluss mit schweren hypoxischen Zuständen beobachtet. Dies unterstreicht die Notwendigkeit eines pränatalen Screenings Ductus-abhängiger Vitien im Sinne einer Neuroprotektion bei diesen Kindern.

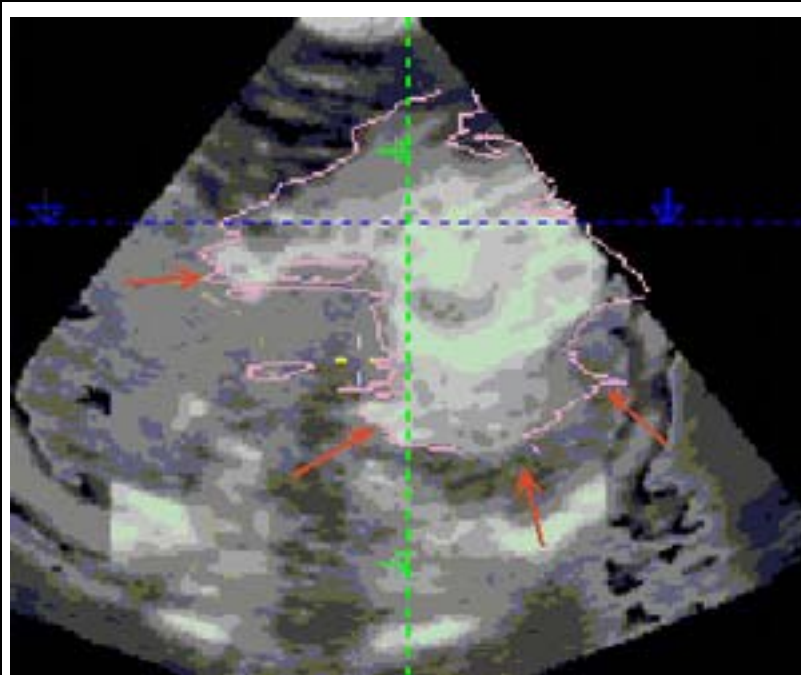


Abbildung 2.1.2.: Coronschnittebene des Gehirns zeigt ausgedehnte parenchymatöse Blutungen bei einem 14 Tage alten Neugeborenen mit einem Ductus-abhängigen Vitium (Mitralatresie mit hypoplastischem Aortenbogen) nach Entlassung aus der Geburtsklinik. Das Kind wurde im Schockzustand in die Klinik eingeliefert (art. pH 6.7) und das Schädelsonogramm zeigte den abgebildeten intrakraniellen Befund. Aufgrund der ausgedehnten Blutung konnte das Kind nicht operiert werden und starb an den Folgen seiner Komplikationen.

2.2. *Evaluierung pathologischer intrakranieller Befunde mit dem 3D -Ultraschall*

Die 2-dimensionale Ultraschalluntersuchung des Gehirns über der Fontanelle bei Neugeborenen ist eine häufig angewandte nichtinvasive Methode zur Beurteilung der normalen und pathologischen Gehirnmorphologie¹⁰². Die Früherkennung von sonographisch sichtbaren intrazerebralen morphologischen Abnormalitäten bei Neugeborenen vor und nach Korrekturoperationen ist von besonderer diagnostischer und prognostischer Wichtigkeit¹⁰³⁻¹⁰⁷.

In der Diagnostik komplexer angeborener Herzfehler führte die 3-dimensionale Echokardiographie (3D), welche auf einer Aufnahme sequentieller multipler Querschnitte des Herzens beruht ¹⁰⁸, bereits zu einer qualitativen Verbesserung der Diagnose. Ausgehend von eigenen Erfahrungen mit der dreidimensionalen Echokardiographie wurde versucht, auch ultrasonographische transfontanelle Studien dreidimensional zu rekonstruieren und auf ihren Informationsgehalt zu untersuchen.

2.2.1. Methode

Ein konventionelles, kommerziell verfügbares Ultraschallgerät der Firma Vingmed (Horten, Norwegen) mit mechanischen Schallköpfen wird mit einem Computer der Firma Tomtec (München), welcher aus den verschiedenen Schnittbildern dreidimensionale Rekonstruktionen errechnen kann, verbunden. Um vom Gehirn Datensätze zu erhalten, welche dreidimensional rekonstruiert werden können, ist es erforderlich, multiple Schnittebenen des Hirns sequentiell aufzunehmen. Ein 5 MHz Schallkopf wird von einem computergesteuerten Motor im Inneren eines offenen Zylinders um 180 Grad um seine vertikale Achse gedreht ^{109 105}. Bei jeder Drehung um jeweils 1 Grad wird eine Schicht des Gehirns aufgenommen, so daß man 180 Schichten erhält, welche den dreidimensionalen Datensatz bilden. Nach der Aufnahme und Speicherung der Datensätze können diese am Computer analysiert werden. Die jeweilige dreidimensional rekonstruierte Schnittebene des Datensatzes kann weiterhin um jede beliebige räumliche Achse gedreht werden.

2.2.2. Patienten

Es wurden 32 Neugeborene und kleine Kinder untersucht, davon 11 mit kompletter Transposition der großen Gefäße, 6 mit komplettem atrioventrikulären Septumdefekt und jeweils eins mit Aortenisthmusstenose, 3 Pulmonalatresie mit Ventrikelseptumdefekt und 3 Mitralatresie und 11 mit anderen angeborenen Vitien. Das mediane Alter zum Zeitpunkt der Untersuchung betrug 3 (1 bis 18) Tage. Alle Neugeborenen waren beatmet und zum Zeitpunkt der Untersuchung hämodynamisch stabil.

2.2.3. Ergebnisse

Die Aufnahme der zur dreidimensionalen Rekonstruktion erforderlichen multiplen Querschnitte dauerte weniger als 45 Sekunden. Bei allen Patienten gelang es, Datensätze aufzunehmen, welche qualitativ so gut waren, daß sie später dreidimensional rekonstruiert werden konnten.

Eine Sedierung der Neugeborenen war in keinem Fall erforderlich. Es konnten sämtliche konventionelle Schnittebenen dreidimensional sowie neue Schnittebenen, welche bisher nicht

darstellbar waren, rekonstruiert werden. Die Rekonstruktion der einzelnen Schichten dauerte zwischen 2 und 33 Minuten, wobei die meiste Zeit für die Auswahl der optimalen Schnittebene im Datensatz, welche rekonstruiert werden sollte, benötigt wurde.

In den Abbildungen 2.2.3 ist dargestellt, wie diese neuen Schnittebenen aussehen und wie diese aus konventionellen 2-dimensionalen Daten rekonstruiert werden können. Neuropathologische Befunde wurden bei 2 Kindern diagnostiziert.

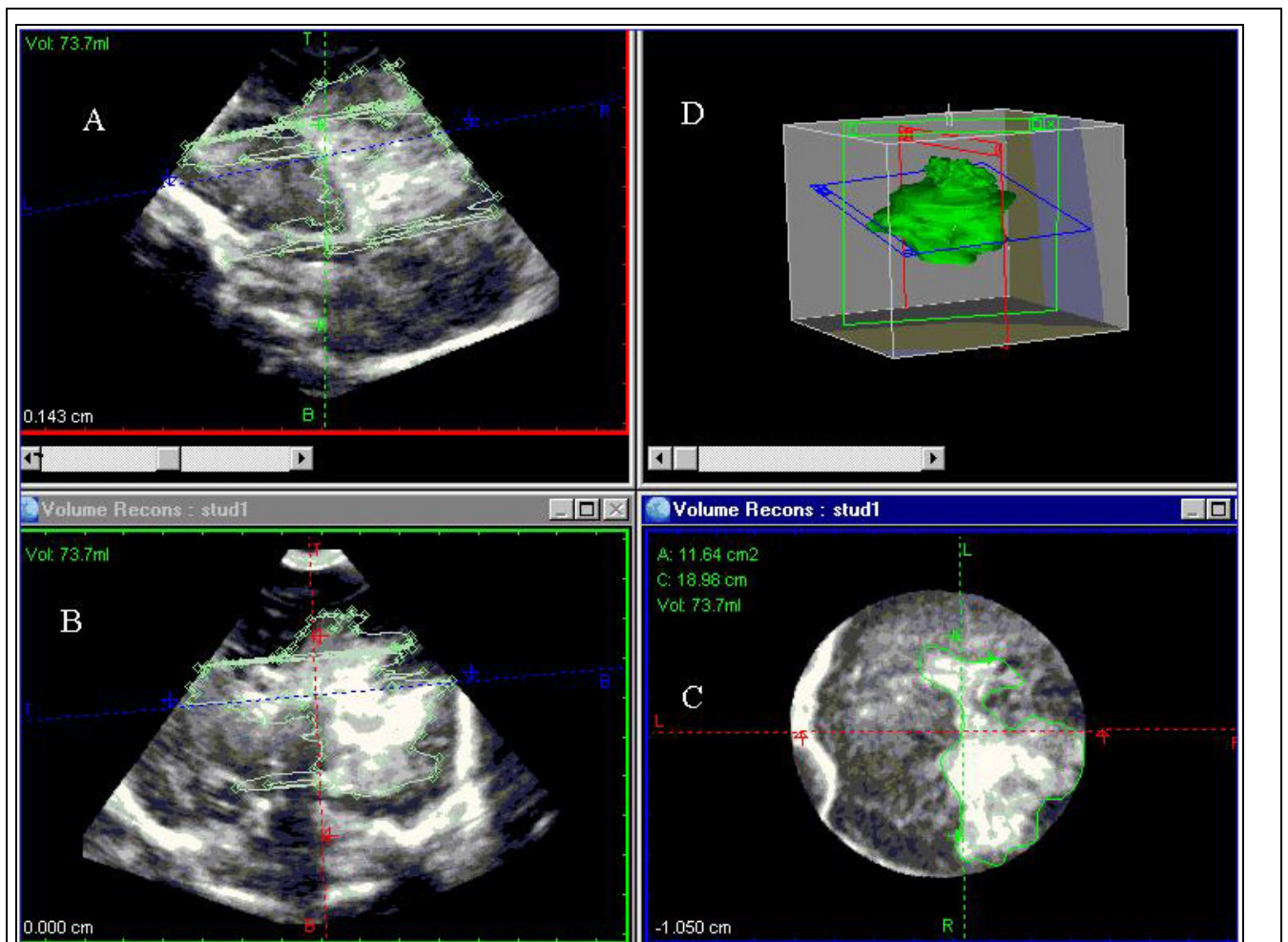


Abbildung 2.2.1: . Multiple Schnittebenen durch den Schädel bei einem Neugeborenen mit Mitralatresie und massiver Parenchymblutung (PVH) im rechten Temporallappen. Die sagittale (A), coronare (B) und transversale Schnittebene sind aus dem 3-dimensionalen Datensatz dargestellt. Links oben (D) ist die entsprechende dreidimensionale Rekonstruktion der Läsion dargestellt, welche eine genaue Abgrenzung der räumlichen Ausdehnung der Blutung erlaubt. Das Errechnen von multiplen transversalen Schnittflächen der Hirnläsion mit einer definierten Dicke von cranial nach caudal erlaubt die Ermittlung des Läsionsvolumens in ml. Damit können intracranielle Strukturen in ihrer Abgrenzung und Ausdehnung genauer beurteilt werden.

Ein Neugeborenes mit Mitralatresie und hypoplastischem Aortenbogen war im Alter von 10 Tagen klinisch mit einem Kreislaufkollaps und einer schweren Azidose auffällig geworden und

entwickelte präoperativ eine ausgedehnte periventrikuläre Blutung im temporoparietalen Hirnlappen mit den Zeichen eines schweren Hirnödems, welche als Kontraindikation für eine Herzoperation angesehen wurde.

Im Vergleich zur konventionellen Ultraschalluntersuchung kann man in der Rekonstruktion die Mittellinierverschiebung besser erkennen und eine genauere Aussage über die Ausdehnung der Blutung in kranialer Richtung machen, indem man das Gehirn in verschiedenen übereinander liegenden Schnittebenen rekonstruiert (Abbildung 2.2.1A und B).

2.3. Neuropathologische Analyse von Hirnveränderungen bei verstorbenen Kindern mit angeborenen Herzfehlern

Der Zusammenhang zwischen neuropathologischer Manifestation und dem Vorhandensein einer angeborenen Malformation des Herzens ist in der Literatur nicht systematisch untersucht. Bisherige neuropathologische Studien zeigten eine große Anzahl von ischämischen oder embolischen Infarkten sowie Entzündungen im Gehirn Verstorbener mit angeborenen Herzfehlern^{34,110-114}. Die Frage, ob zu den erworbenen Hirnläsionen nach Korrekturoperationen angeborener Herzfehler zusätzlich assoziierte Malformationen des Zentralnervensystems vorliegen, ist unklar. Die Beeinträchtigung der psychomotorischen und kognitiven Entwicklung bei mehreren Follow-up-Studien bei Kindern nach Korrekturoperationen komplexer Vitien ohne eindeutige Identifikation des genauen Pathomechanismus dieser späteren Störungen lässt spekulativ auf zusätzliche kongenitale Läsionen schließen^{2,6,8,32,110}.

Durch die regelmäßige systematische Auswertung der Autopsien verstorbener Kinder im Rahmen der Letalitätskonferenz Berliner Pädiater und Pathologen am Virchow Klinikum war es möglich, die neuropathologischen Befunde von 52 Kindern mit angeborenem Herzfehler mit oder ohne Korrekturoperation zu analysieren und histologisch neu zu bearbeiten.

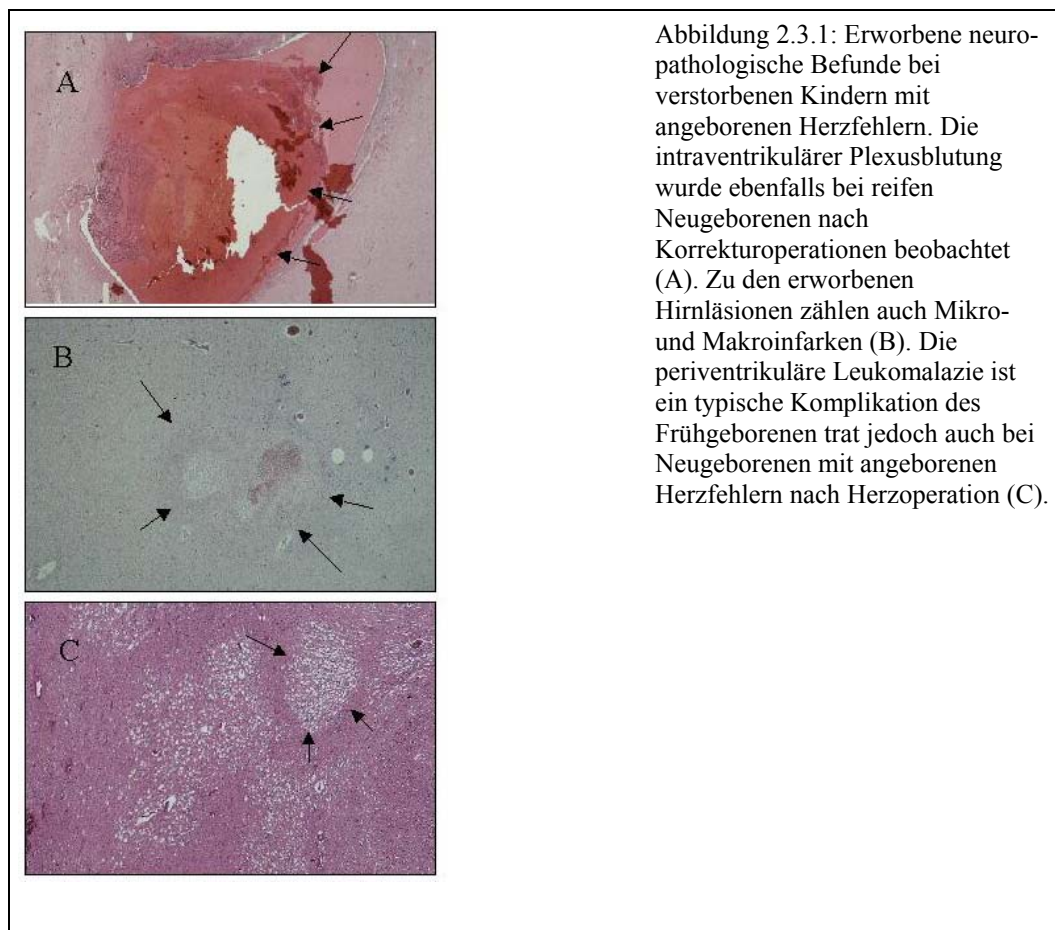
2.3.1. Methode:

Gehirne von 52 in der Zeit zwischen 1990 und 1999 verstorbenen Kindern im medianen Alter von 1,25 Jahren (1 Tag- 17 Jahren) wurden vollständig nachuntersucht. Von diesen Kindern wurden 47 kardiochirurgisch behandelt, hiervon 26 unter dem Einsatz der extrakorporalen Zirkulation (EKZ). Die Hauptdiagnosen der operierten Kinder waren hypoplastisches Linksherzsyndrom in 7, Transposition der großen Arterien (d-TGA) in 11 und komplexe kardiale Fehlbildungen in 8 Fällen.

Aus mit Paraffin eingebetteten Gehirnen wurden Standardschnitte für unterschiedliche histologische und immunhistochemische Färbung angefertigt. Der apoptotische neuronale Zelltod wurde nach der TUNEL-Methode (terminal transferase-mediated dUTP-digoxigenin nick end-labeling) (Boehringer, Mannheim, Germany) gefärbt.

2.3.2. Ergebnisse:

Von 20 festgestellten ischämischen Nekrosen war nur ein Infarkt embolisch bedingt. Der häufigste makroskopische Befund waren Blutungen in 25 Fällen (subarachnoidal n=16, intraventrikulär n=9). Das Auftreten von intraventrikulären Blutungen korrelierte mit der Reduktion des Hirngewichtes ($p<0,05$) und der Diagnose d-TGA ($p<0,05$), jedoch nicht mit der Frühgeburtlichkeit oder mit dem Einsatz der EKZ.



25% der untersuchten Kindergehirne zeigten angeborene Malformationen mit Ausnahme der TGA-Gruppe. Retardierte Kortexarchitektur und Gefäßentwicklung wurde in 11 Fällen beobachtet. Das Hirngewicht lag in 33 Fällen unter der 10. Perzentile.

In unserem untersuchten Kollektiv unterscheidet sich das Läsionsmuster von früheren neuropathologischen Studien bei Kindern mit angeborenen Herzfehlern. Die zentralen Blutungen

haben sowohl an Häufigkeit als auch im Ausmaß zugenommen, Infarkte und Entzündungen traten seltener auf. Der Herz-Lungen-Maschine scheint kein spezifisches Schädigungsmuster zuzuordnen zu sein

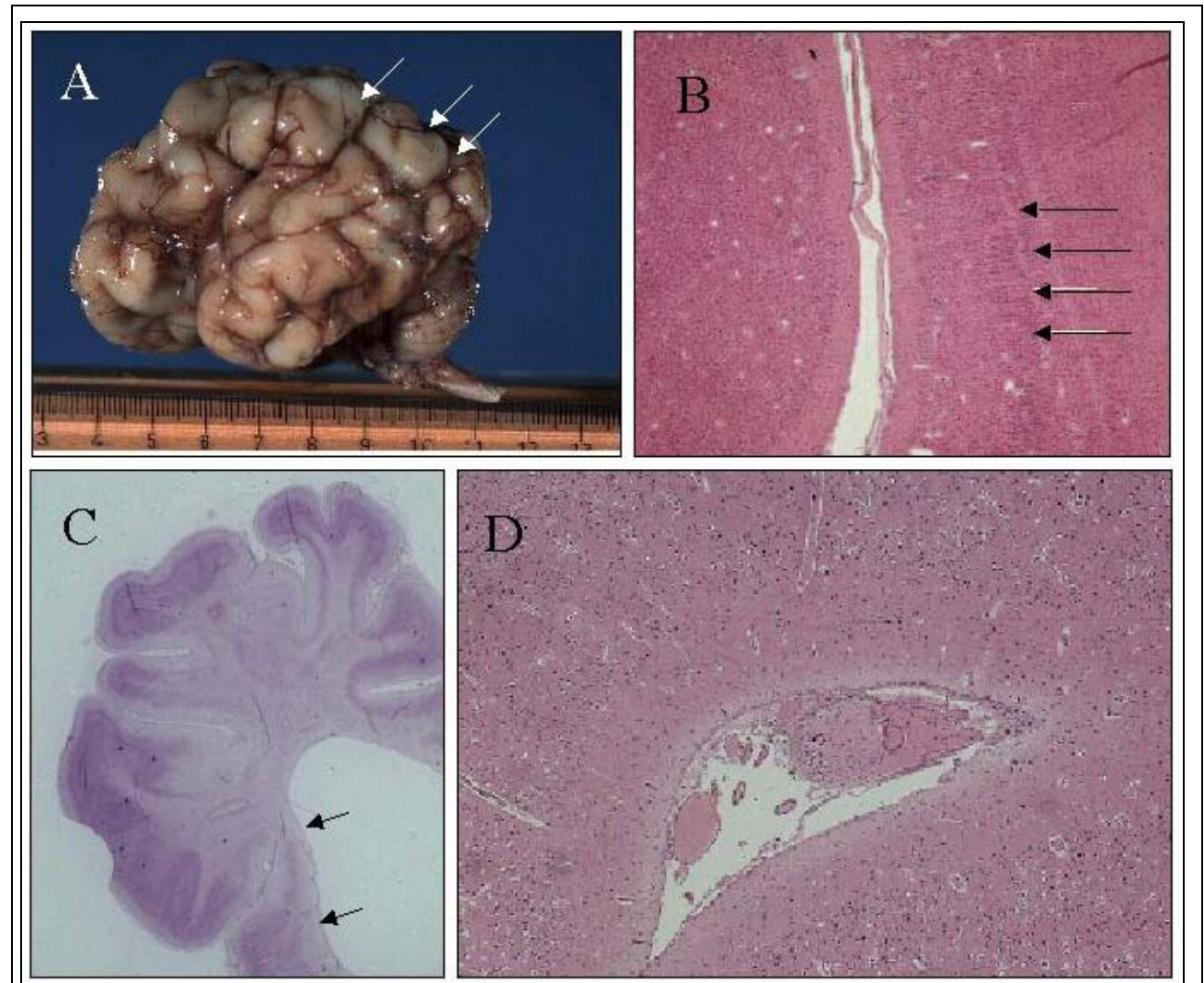


Abbildung 2.3.2: Kongenitale Hirnläsionen, welche assoziiert mit den angeborenen Herzfehlern vorkamen. A. Ulegyrie mit Hirnatrophie, B. Kortikale Entwicklungsretardierung im Großflächenschnitt in Form von säulenartig angeordneten Areale bei einem reifen Kind (HE, x4). C. Hydrocephalus internus evacuatus wird häufig bei Kindern mit angeborenen zyanotischen Herzfehlern beobachtet. D. Zentral gelegene Leptomeningeale neuronale Heterotopie im Subarachnoidalraum (HE10x).

2.4. Psychiatrische Komorbidität und kognitive Entwicklung bei Schulkindern mit Fallotscher Tetralogie

Kinder mit angeborenen Herzfehlbildungen zeigen ein erhöhtes Risiko zur Entwicklung kognitiver Leistungsminderung sowie fein- und grobmotorischer Entwicklungsstörungen im Vorschulalter^{2,3,8,115}. Trotz insgesamt durchschnittlicher Intelligenz bei der Mehrzahl der Kinder finden sich neben Sprechstörungen Auffälligkeiten im allgemeinen kognitiven Leistungsvermögen sowie bei spezifischen Teilleistungen^{3,8}. Die häufigsten psychomotorischen Defizite liegen in der Sprach- und feinmotorischen Leistung^{3,8}. Prospektive Follow-up-Studien bei Kindern bis zum Schulalter fehlen. Die einzige kontrollierte Studie in diesem Zusammenhang ist die von Bellinger und Kollegen durchgeführte Follow-up-Studie aus Boston³.

In unserer Klinik konnten wir in einer Querschnittsstudie eine homogene Gruppe von Schulkindern im Alter von 8-14 Jahren nach Korrekturoperationen einer Fallotschen Tetralogie im Kleinkindesalter in Bezug auf ihre kognitive Leistungsfähigkeit und jugendpsychiatrische Komorbidität mit Hilfe des Hamburg-Wechsler-Intelligenztest für Kinder (HAWIK III) untersuchen¹¹⁶.

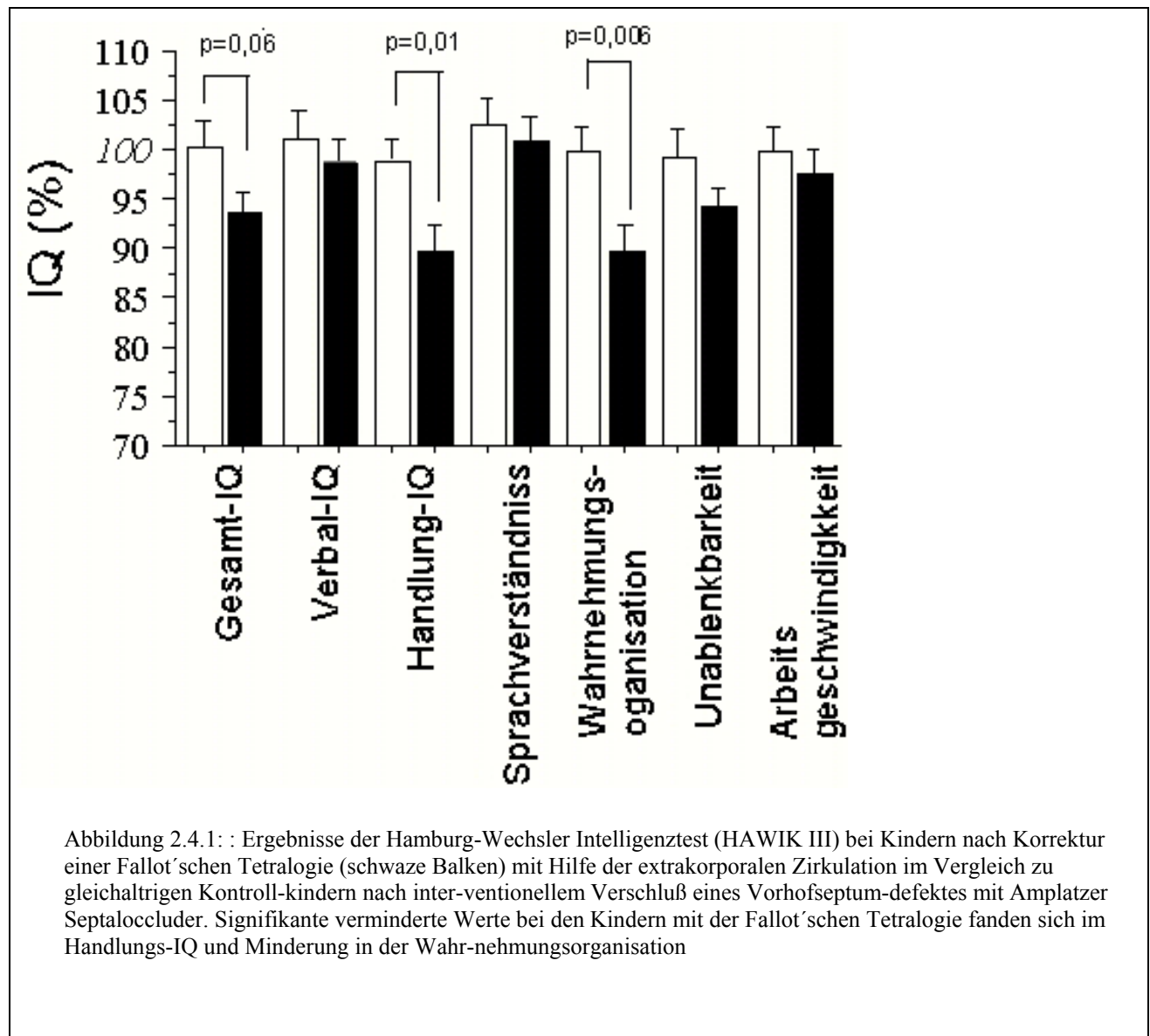
2.4.1. Methodik:

20 Kinder zwischen 8 und 14 Jahren mit einer Fallot'schen Tetralogie und operativer Korrektur mit Hilfe der EKZ ohne Kreislaufstillstand wurden zur Erfassung der psychiatrischen Symptomatik mit dem kinderpsychiatrischen Interview (DIPS) sowie der Child Behavior Checklist (CBCL) in der Eltern- und Lehrerform untersucht. Zur Erfassung der kognitiven Leistungsfähigkeit führten wir den HAWIK III sowie den d2-Konzentrationstest durch. 20 gleichaltrige Kinder mit einem Vorhofseptumdefekt von Sekundum-Typ und interventionellem Verschuß des Defekts wurden als Kontrollgruppe den gleichen Tests unterzogen. Beim HAWIK-III handelt es sich um einen Intelligenztest für die Einzeluntersuchung von Kindern und Jugendlichen. Dieses Verfahren stellt die deutsch-sprachige Adaptation der Wechsler Intelligence Scale for Children-Third Edition (WISC-III; Wechsler,1991) dar und löste den 1983 erschienenen HAWIK-R ab¹¹⁶.

2.4.2. Ergebnisse:

Insgesamt lagen die kognitiven und psychomotorischen Leistungen bei den Kindern mit Fallot'scher Tetralogie bei über 85% des normalen Bereiches für normale Kinder in diesem Alter (Abb. 2.4.2-1). Beide Gruppen unterschieden sich nicht signifikant hinsichtlich Alter und Gewicht. Das jährliche Einkommen und Bildungsgrad der Eltern war in beiden Gruppen nicht signifikant unterschiedlich. Im

Vergleich mit der Kontrollgruppe zeigten die Kinder mit Fallot'scher Tetralogie einen niedrigeren Gesamt-IQ ($p=0,06$) und signifikant niedrigere Werte in einzelnen Untertests wie Handlungs-IQ ($p=0,01$) und Wahrnehmungsorganisation ($p=0,006$) (Abb. 2.4-1). Der Gesamt-IQ korrelierte nicht signifikant mit der Zahl der Operationen, der Dauer der EKZ, Grad der Hypothermie während der EKZ. Die Untersuchungen der psychiatrischen Ko-Morbidität zeigten keine signifikanten Unterschiede im Vergleich zu der Kontrollgruppe.



3. Untersuchung der zerebralen Perfusion während und nach Korrekturoperationen angeborener Herzfehler

3.1. Veränderung der zerebralen Perfusion nach Korrekturoperationen angeborener Herzfehler

Das Auftreten von zerebralen Schädigungen ist sicherlich durch signifikante Beeinträchtigung der regionalen oder der globalen Hirnperfusion wesentlich mitbedingt¹¹⁷⁻¹²⁵. Daher ist die Überwachung der zerebralen Perfusion mit nicht-invasiven Methoden während und nach der Operation von klinischer Bedeutung. Die Messung der Blutflussgeschwindigkeiten in den basalen zerebralen Gefäßen mit Hilfe der transkraniellen Dopplersonographie (TCD) bietet qualitative Informationen über die regionale Durchblutung und den zerebrovaskulären Widerstand im jeweiligen Flussgebiet¹²⁶⁻¹²⁹. Über die Validität der TCD zur qualitativen Beurteilung der zerebralen Perfusion während der hypothermen Perfusion der EKZ ist in verschiedenen Studien unterschiedlich berichtet worden¹²⁶⁻¹³¹. Die kontinuierliche Registrierung der zerebralen Flussgeschwindigkeiten in der Arteria cerebri media mit einem kleinen Schallkopf, der an der Schläfe befestigt wird, bietet daher Informationen über den Flusszustand während der unterschiedlichen Phasen der extrakorporalen Zirkulation. Insbesondere der Einfluss verschiedener hämodynamischer Parameter wie Temperatur, Perfusionsdruck und Flussrate der extrakorporalen Zirkulation auf die zerebrale Perfusion während und nach der EKZ sollen evaluiert werden.

3.1.1. Transkranielle Dopplersonographie

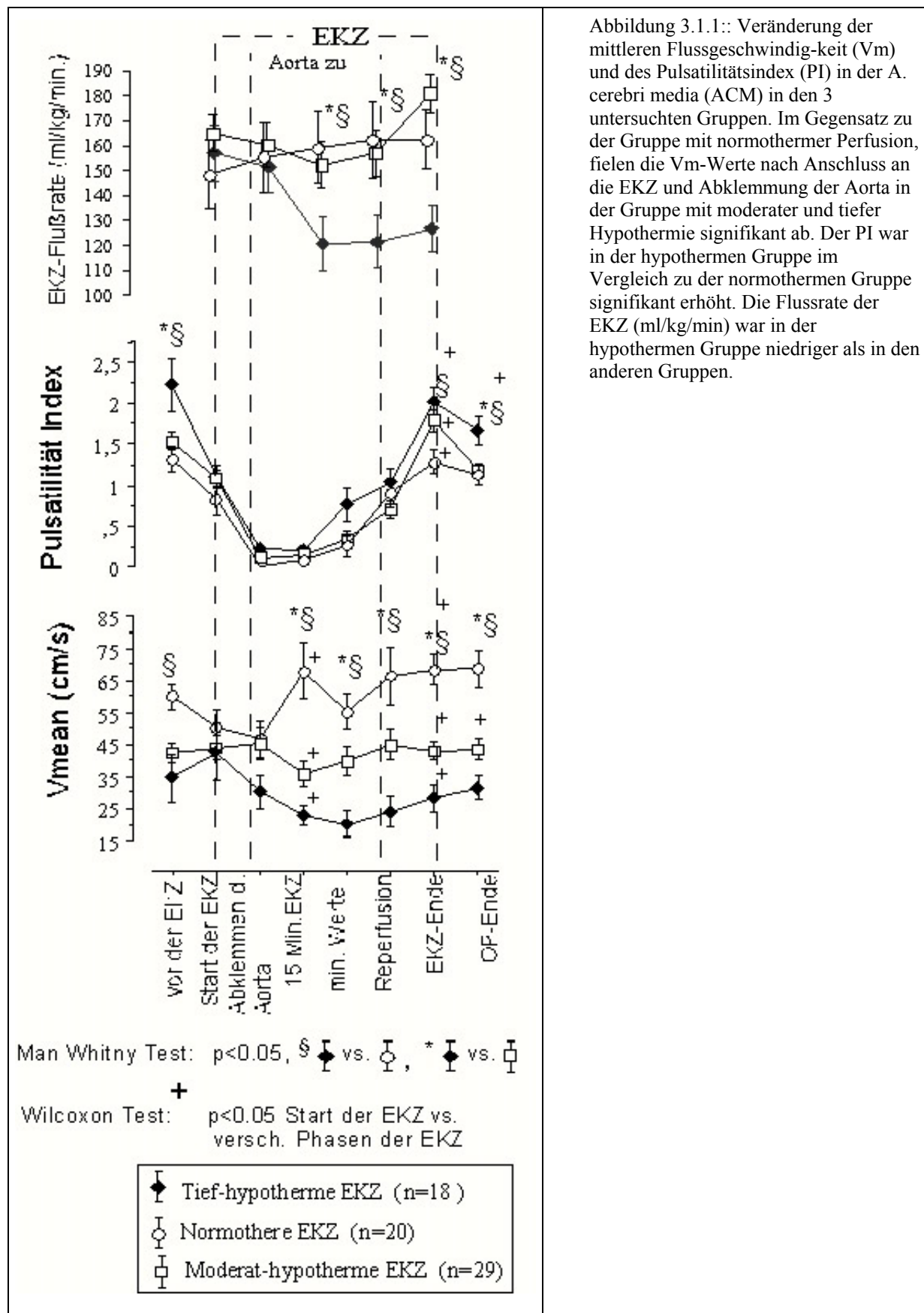
Die Blutflussgeschwindigkeiten wurden mit transkranieller Dopplersonographie bestimmt (Multi-Dop-P. DWL-Sipplingen, Deutschland)^{131,132}. Die mittlere Flussgeschwindigkeit (V_m) bietet eine qualitative Information über die regionale Hirnperfusion¹³³. Der Pulsatilitätsindex (PI), errechnet nach der Formel: $PI = \frac{\text{maximale Flussgeschwindigkeit} - \text{enddiastolische Flussgeschwindigkeit}}{\text{mittlere Flussgeschwindigkeit}}$, dient zur qualitativen Beurteilung des zerebrovaskulären Widerstands. Während der Korrekturoperationen wurde ein 2 MHz Schallkopf am linken Temporalfenster zur kontinuierlichen Messung der Flussgeschwindigkeit in der A. Cerebri Media (ACM) platziert. Das akustisch und visuell beste Flussmuster wurde nach Einstellung von Messvolumen, Tiefe und Dopplerverstärkung erhalten. Das Messvolumen wurde bei 1,5 mm, die Tiefe bei 3,5-4,5 cm gehalten. Der mittlere Wert von PI und V_m in 8 Herzzyklen wurden zur weiteren Analyse errechnet und dokumentiert.

3.1.2. Ergebnisse

Die unterschiedlichen präoperativen Werte der mittleren Flussgeschwindigkeit (V_m) in der A. cerebri media (ACM) waren alters- und gewichtsabhängig (Abbildung 3.1.1). Die transkraniellen Dopplerparameter näherten sich mit Kanülierung und Beginn der EKZ bei den drei Patientengruppen einander an (Abbildung 3.1.1). Nach Abklemmen der Aorta war ein signifikanter Anstieg der V_m -Werte ($p=0,01$) bei den überwiegend nicht-zyanotischen Kindern in der normothermen Gruppe zu verzeichnen, während bei den Kindern in tiefer und moderater Hypothermie ein langsamer Abfall der V_m ($p=0,02$) auftrat (Abbildung 3.1.1).

Die Neugeborenen und Säuglinge in der tief-hypothermen Gruppe hatten die niedrigsten V_m -Werte während und nach Beendigung der EKZ und unterschieden sich signifikant von den Kindern in den beiden anderen Gruppen (Abbildung 3.1.1). Acht von zehn Kindern in der tief-hypothermen Gruppe hatten einen hämodynamisch wirksamen persistierenden Ductus, was mit einer Erniedrigung des enddiastolischen Flusses und daraus resultierend mit einem signifikant erhöhtem Pulsatilitätsindex vor der EKZ einherging ($p<0.01$) (Abbildung 3.1.1).

Die systolischen und diastolischen Flussgeschwindigkeiten glichen sich nach Abklemmen der Aorta an. Erst mit Beendigung der EKZ stieg der PI in allen Gruppen unterschiedlich stark an. Auch nach Ende der Operation bestätigte sich der Trend der erhöhten PI-Werte in der tief-hypothermen Gruppe (Abbildung 3.1.1).



3.1.3. Einflussfaktoren auf die Veränderung des zerebralen Flussmusters während Korrekturoperationen angeborener Herzfehler

Die Werte der mittleren Flussgeschwindigkeiten (V_m) korrelierten während der unterschiedlichen Phasen der EKZ signifikant mit dem Alter und Gewicht der Kinder (Tabelle 3.1.1). Der Einfluss des Perfusionsdruckes und der Körpertemperatur war ebenfalls während und nach Ende der EKZ unterschiedlich ausgeprägt (Tabelle 3.1.1).

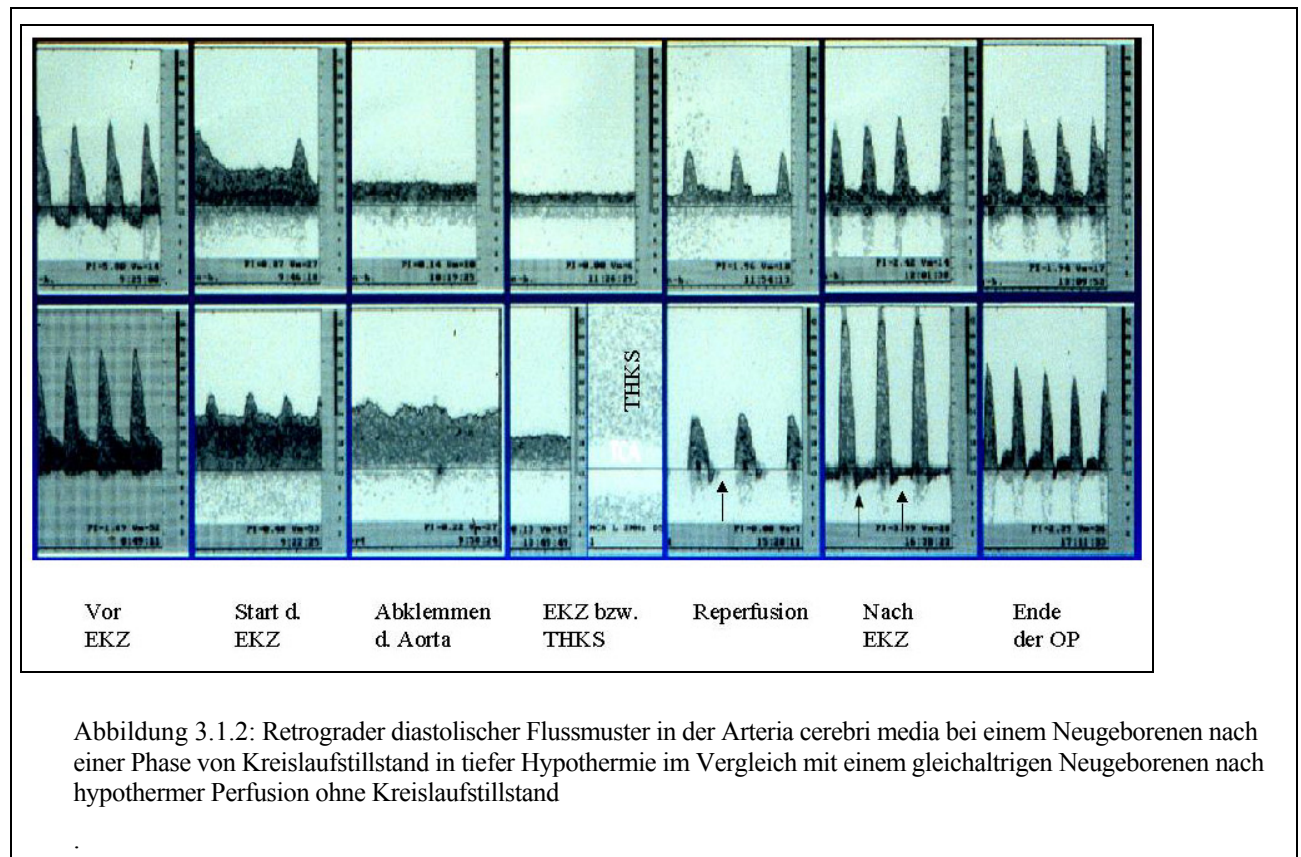
Ein Zusammenhang der V_m mit dem Hämoglobinwert war auf die Phase nach Ende der EKZ begrenzt. Die Altersabhängigkeit der Veränderungen im Pulsatilitätsindex (PI) war weniger ausgeprägt.

Tabelle 3.1.1: Einflussfaktoren auf die zerebrale Perfusion.

	Alter Monate)	Gewicht (Kg)	rekt. (°C)	MAD mmHg	pCO ₂ mmHg	Hb mg/dl
V_m min. Werte	0.73 <0.0001	0.76 <0.0001	0.66 <0.0001	0.42 0.007	0.14 n.s	0.1 n.s
V_m Reperfusion	0.84 <0.0001	0.88 <0.0001	0.64 0.0002	0.52 0.002	0.028 n.s	0.15 n.s
V_{mean} EKZ-Ende	0.79 <0.0001	0.76 <0.0001	0.48 0.003	0.63 0.0001	-0.24 n.s	-0.55 0.002
V_m OP-Ende	0.79 <0.0001	0.75 <0.0001	0.69 <0.0001	0.5 0.001	0.01 n.s	-0.03 n.s
PI Reperfusion	-0.45 0.008	-0.25 n.s	0.1 n.s	0.07 n.s	0.06 n.s	0.1 n.s
PI EKZ-Ende	-0.56 0.0002	-0.45 0.003	-0.15 n.s	-0.42 0.007	0.08 n.s	0.26 n.s
PI OP-Ende	-0.41 0.006	-0.45 0.004	-0.40 0.009	-0.19 n.s	0.21 n.s	-0.03 n.s

3.1.4. Einfluss des Kreislaufstillstandes

Kreislaufstillstand in tiefer Hypothermie ist erforderlich um Malformationen am Herzen oder an den herznahen Gefäßen, insbesondere im Bereich des Aortenbogens zu korrigieren. Einige Studien bei Neugeborenen haben ein abnormes Flussmuster in Form eines retrograden diastolischen Flusses während der Reperfusionsphase nach dem tief hypothermen Stillstand in der Arteria cerebri media gezeigt^{117,134}. Diese abnorme zerebrale Flussveränderung war nicht zu beobachten, wenn eine kühle Reperfusion nach dem Kreislaufstillstand durchgeführt wurde¹¹⁷. Ähnliche abnorme Flussmuster wurden nur bei einigen der untersuchten Kinder beobachtet (Abbildung 3.1.2).



3.2. Veränderung der zerebralen Perfusion nach Korrekturoperationen angeborener Herzfehler

Die zerebrale Perfusion nach Ende der EKZ kann in der früh-postoperativen Phase weiter beeinträchtigt bleiben. Die kardiovaskuläre Anpassung nach Korrekturoperationen angeborener Herzfehler geht häufig mit einem niedrigen Herzzeitvolumen und einem erhöhten Pulmonalwiderstand einher. Diese kardiopulmonalen Zustände können auch die zerebrale Perfusion beeinflussen^{119,131,132,135,136}. Wir untersuchten daher die zerebralen Flussgeschwindigkeiten in der Arteria cerebri anterior und Arteria cerebri media mit Hilfe der transfontanellen Dopplersonographie während der frühpostoperativen Phase.

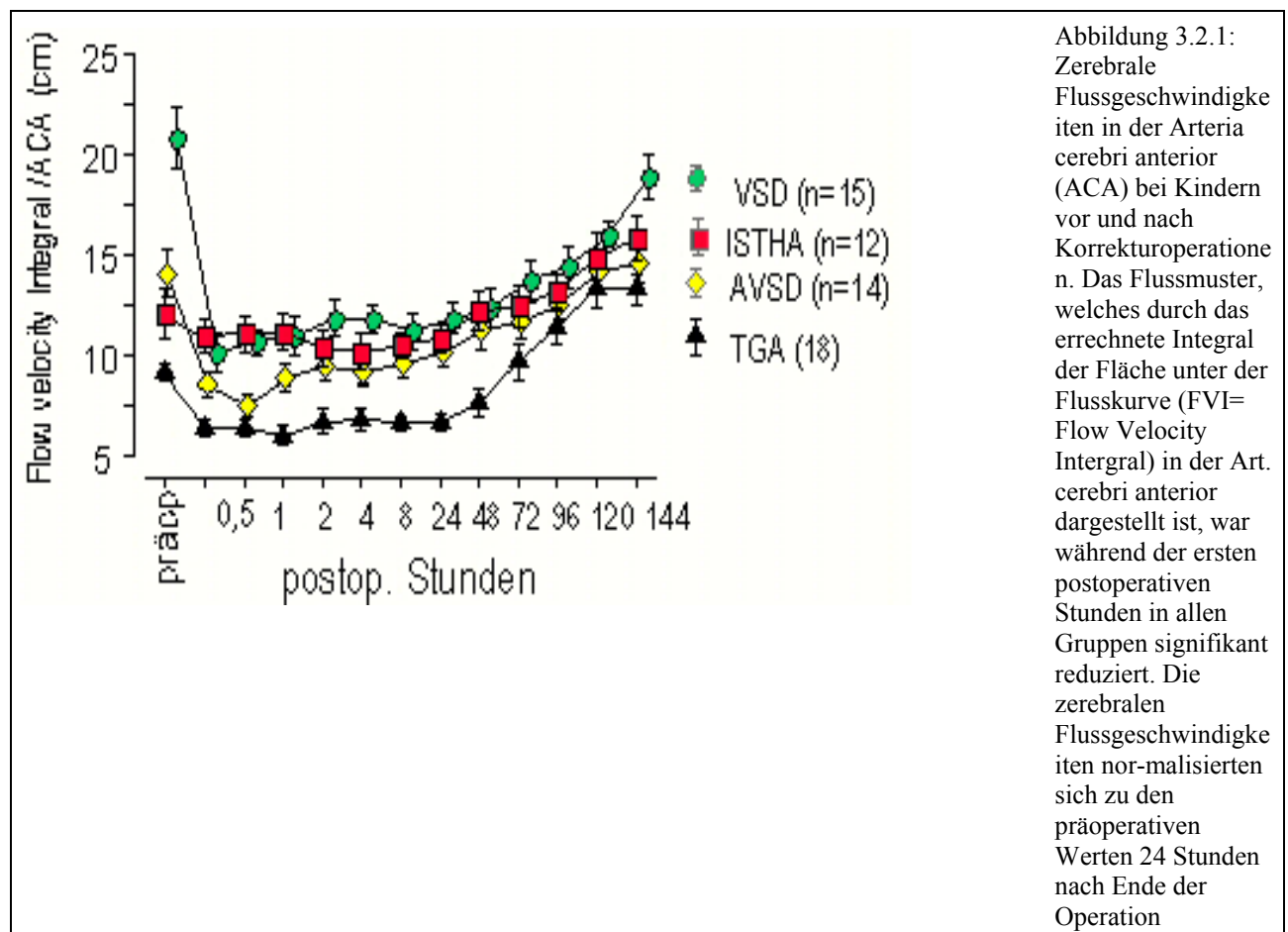
3.2.1. Ergebnisse

Vier homogene Gruppen von Kindern (Tabelle 3.2.1) wurden seriell vor und bis 144 Stunden nach den Herzoperationen untersucht. Fünfzehn Neugeborene nach Korrekturoperation einer Isthmusstenose ohne den Einsatz der EKZ dienten als Kontrollgruppe. Bei allen Kindern zeigte sich ein Abfall der zerebralen Flussgeschwindigkeiten während der ersten postoperativen Stunden, welche sich erst 24 Stunden nach der Operation normalisierten. Die Flussgeschwindigkeiten waren gewichts- und altersabhängig. Im Gegensatz zu den Gruppen von Kindern mit d-Transposition der großen Arterien (d-TGA), Ventrikelseptumdefekt (VSD), und atrioventrikulärer Septumdefekt

(AVSD) waren die zerebralen Flussgeschwindigkeiten bei den Kindern nach Korrektur einer Isthmusstenose (ISTA) ohne den Einsatz der EKZ nicht signifikant erniedrigt.

Tabelle 3.2.1: : Klinische Daten der untersuchten Kinder (Mean, Range)

Diagnose	Alter bei Op (Monate)	Gewicht (kg/KG)	Bypasszeit (minute)	Minimale rektale Temperatur während EKZ (°C)
d-TGA (n=18)	0,46 (0,16-2)	3,47 (2,84-4,5)	227 (147-540)	19,1 (15,8-30,5)
AVSD (n=14)	5,12 (3-9)	4,58 (3,5-6,2)	110 (66-203)	27,6 (24,2-32)
VSD (n=15)	5 (1-7,5)	5,2 (3-8)	68 (53 -102)	33,4 (31-36,7)
Istha (n=12)	0,1 (0,1-51)	5,6 (2,24-13)	0	36



3.2.2. Zusammenhang zwischen der Veränderung in der zerebralen Perfusion und dem Auftreten zerebraler Schädigung in der postoperativen Phase

Sichtbare Hirnläsionen traten am häufigsten in Form von intraventrikulärer Plexusblutung bei Neugeborenen nach Switch-Operationen mit linksventrikulärer Funktionsstörung auf (Tabelle 3.2.2). Die simultane serielle Untersuchung des Schädel-Ultraschalls und der Flussgeschwindigkeit in der Arteria cerebri anterior und der Arteria carotis interna bei einer homogenen Gruppe von Neugeborenen vor und nach der Switch-Operation zeigte einen Zusammenhang zwischen dem Auftreten intraventrikulärer Blutungen und Veränderungen des zerebralen diastolischen Flussmusters. Neugeborene, die eine intraventrikuläre Blutung entwickelten, hatten eine erhöhte enddiastolische Flussgeschwindigkeit vor dem sonographischen Nachweis der intraventrikulären Blutung (Abbildung 3.2.2). Nach diesem Ereignis war die enddiastolische Flussgeschwindigkeit bei den Neugeborenen mit intraventrikulärer Blutung niedriger als bei denjenigen ohne intraventrikuläre Blutung.

Tabelle 3.2.2: Klinische Daten der Kinder mit und ohne intraventrikuläre Hemorrhagien (IVH)

	<i>Alter (Tage)</i>	<i>Gewicht (kg)</i>	<i>Bypasszeit (Minuten)</i>	<i>Minimale rektale Temperatur(°C)</i>
IVH (n=9)	10.3±4	3234±317	196±39	21.7±5
ohne IVH(n=12)	6.3±1.2	3416±312	161±23*	24.8±5.6
Man a. Whitney p	0.009	0.33	0.009	0.12

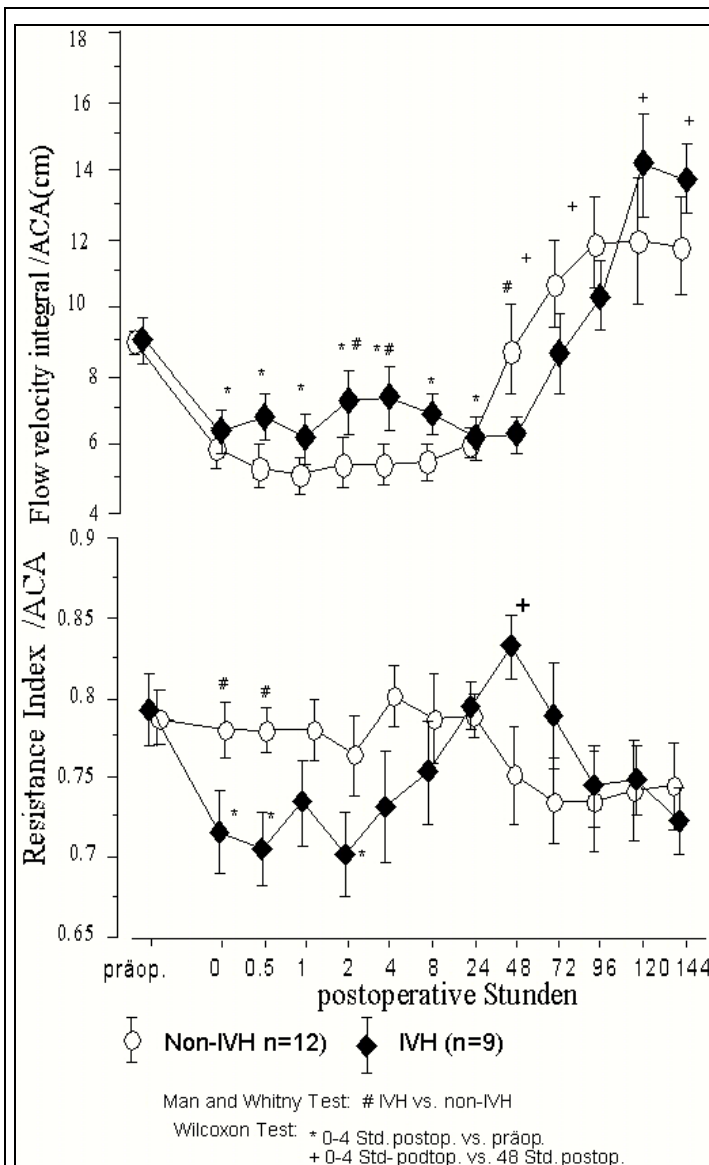


Abb. 3.2.2 A

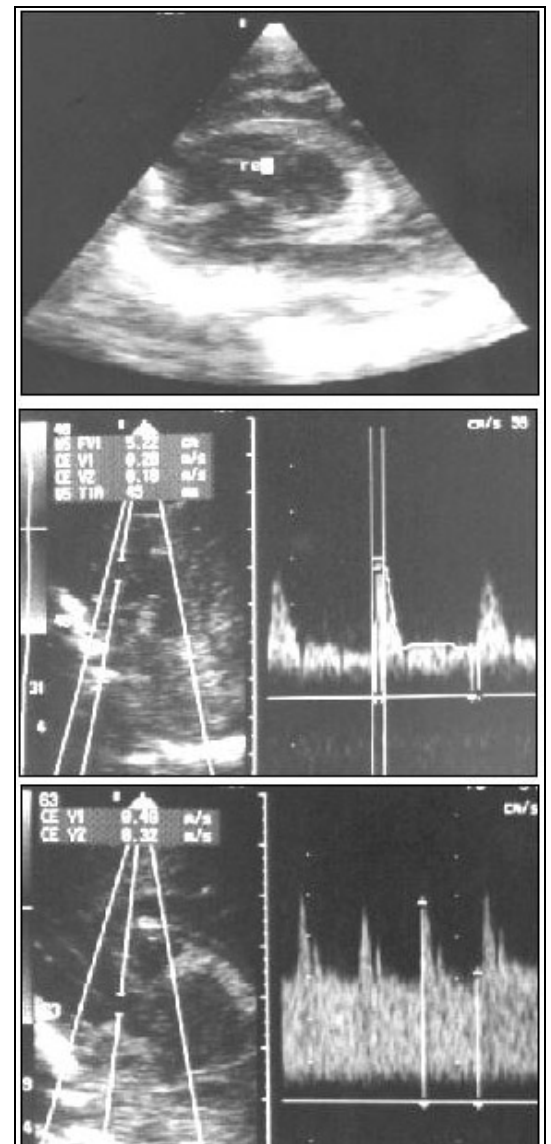


Abb. 3.2.2 B

Abbildung 3.2.2.: Veränderung des zerebralen Flussmusters (Flow Velocity Intergrtal FVI) in der Arteria cerebri anterior (ACA) und carotis interna (ICA) bei den Neugeborenen mit und ohne intraventrikulären Hämorrhagien (IVH) nach Swichoperationen. Die initialen postoperativen FVI-Werte waren signifikant höher in der Gruppe mit IVH (3.2.2 A). In der Gruppe mit IVH fiel der Resistanzindex (RI) während der ersten 8 Stunden postoperativ signifikant ab und stieg 48 Stunden nach der Operation erneut an (3.2.2 A). Diese Veränderung in dem RI war durch Schwankungen in der enddiastolischen Flussgeschwindigkeit bedingt (Abb. 3.2.2.B).

4. Veränderung der zerebralen Oxygenation während und nach Korrekturoperationen angeborener Herzfehler

4.1. Nahinfrarot-Spektroskopie

Die Spektroskopie im nahinfraroten Bereich basiert auf der relativen transkraniellen Penetrationsfähigkeit des Lichtes mit einer Wellenlänge zwischen 700-1000 nm¹³⁷. Die wichtigsten vorkommenden Farbstoffe mit der Absorptionsfähigkeit für das Licht mit dieser Wellenlänge sind das intravaskuläre dynamische Hämoglobin und das intrazelluläre statische Cytochrom aa₃, das letzte Enzym in der mitochondrialen Atmungskette¹³⁷. Beide Stoffe stehen in oxidiertem oder reduziertem Zustand in Wechselwirkung mit Sauerstoff, was von grossem klinischen Interesse für die Quantifizierung des intravaskulären und intrazellulären Sauerstoffmetabolismus ist. Da das Infrarotlicht von dem oxygenierten (HbO₂) und dem desoxygenierten (Hb) intravaskulärem Hämoglobin absorbiert wird, präsentiert die errechnete regionale zerebrale Hämoglobinsättigung (rSO₂) einen relativen, prozentualen Wert aus beiden Hämoglobinformen nach der Formel: $rSO_2 = HbO_2 / (HbO_2 + Hb) * 100$ ^{138,139}.

Die zerebrale Oxygenation während und nach der EKZ wurde mit zwei verfügbaren Geräten registriert. Die initiale transkranielle Messung der regionalen zerebralen Oxygenierung (rSO₂) erfolgte mit einem kommerziell erhältlichen und von der U. S. Food and Drug Administration (FDA) zugelassenen NIRS-Monitorsystem (INVOS 3100A®, Somanetics Corp., Troy, MI, USA). Dieses Gerät ist in der Lage, die regionale gemischt-venöse Blutsättigung in einem kortikalen Hirnareal zu messen.

4.1.1. Validisierung des Zerebraloxyimeters INVOS 3100A

Wir untersuchten in dieser Studie, ob die Verwendung der Nahinfrarot-Spektroskopie (NIRS) in dem Somanetics-Zerebraloxyimeter eine kontinuierliche und zuverlässige nichtinvasive transkranielle Überwachung der regionalen zerebralen Hämoglobinsättigung (rSO₂) in Relation zur jugularvenösen Sauerstoffsättigung (SjvO₂) ermöglicht¹³⁹.

4.1.1.1. Patienten und Methoden

Bei insgesamt 30 Säuglingen und Kindern (mittleres Alter: 4,5 Jahre, Altersspanne: 5 Tage bis 16 Jahre) mit angeborenen zyanotischen und nicht-zyanotischen Herzfehlern wurden die Messungen während elektiver Herzkatheteruntersuchungen durchgeführt. Alle Patienten waren vor der

Untersuchung hämodynamisch stabil und bedurften keiner kardiovaskulären oder pulmonalen Unterstützungstherapie.

Der zerebrale Sensor wurde standardmäßig im Bereich der rechten Frontotemporal-Region fixiert und zusätzlich mit einem zirkulären Adhäsivverband gegen Umgebungslicht geschützt. Dieser NIRS-Sensor bestand aus einem Transmitter für infrarotes Licht (IR) definierter Wellenlängen (730 und 810 nm) und 2 integrierten Empfängeroptoden mit differenten Abständen zum Emitter. Der 1. Detektor, in einem Abstand von 30 mm zur emittierenden Optode, erfasste vorwiegend die oberflächlichen Strukturen (extrakranielle Haut und Schädelkalotte) sowie extrazerebrales Gewebe wie die Hirnhäute, während die zweite Empfängeroptode mit einem Abstand von 40 mm zusätzlich intrazerebrales Gewebe im durchleuchteten Messvolumen umfassen sollte (Abbildung 4.1.1). Das NIRS-Oxymeter subtrahierte die reflektierten IR-Lichtsignale der oberflächlichen von denen der tieferen Strukturen, um die Störeinflüsse durch extrakranielles sowie -zerebrales Gewebe zu minimieren und errechnete fortlaufend nach einem entsprechenden Algorithmus die regionale zerebrale Hämoglobin-Sauerstoffsättigung¹³⁹.

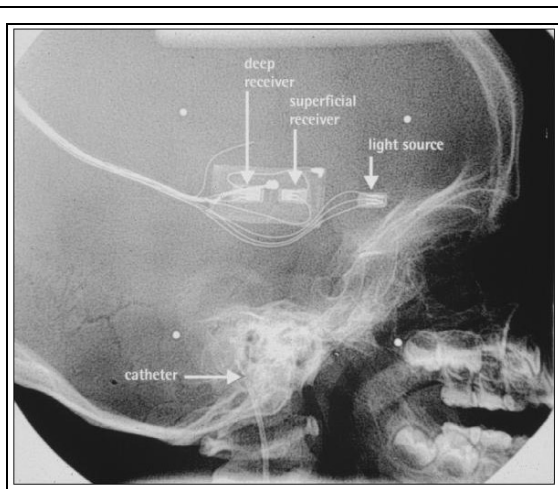


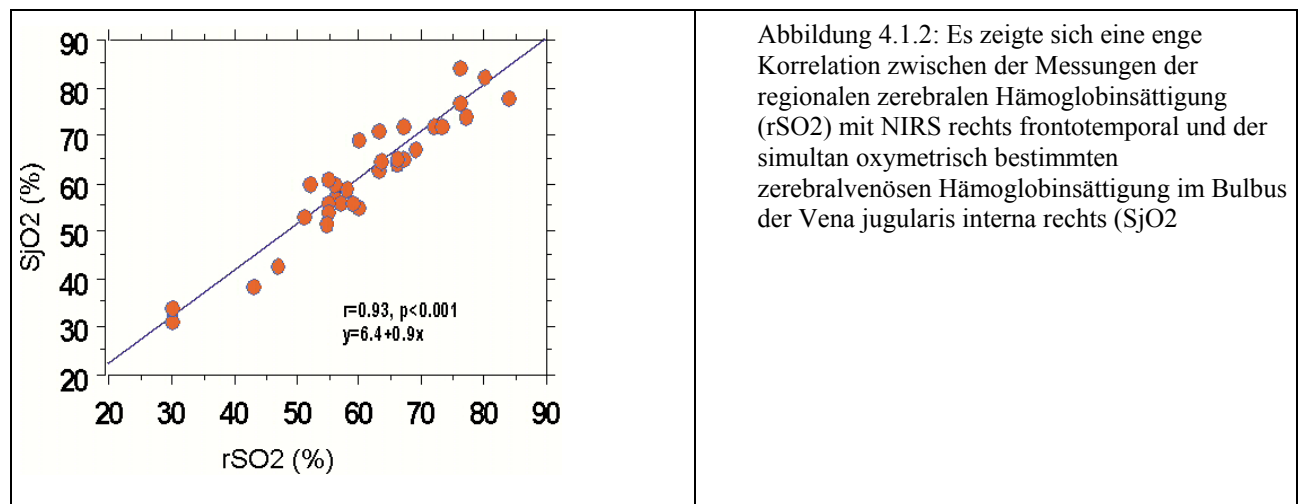
Abbildung 4.1.1: : Röntgenbild der Schädelbasis sowie der oberen Halswirbelsäule eines Kindes mit Darstellung des retrograd positionierten Oxymetrie-Katheters im Bulbus der Vena jugularis interna (Pfeil) und Position des NIRS-Sensors an der gleichen Schädelseite. (light source = Lichtquelle, superficial receiver = oberflächige Empfängeroptode, deep receiver = Tiefenempfänger).

Ein Messkatheter wurde retrograd in der rechten Vena jugularis interna bis zur Schädelbasis vorgeschoben. Die korrekte Lage der Katheterspitze im Bulbus der Vena jugularis wurde durch Röntgendurchleuchtung kontrolliert (Abbildung 4.1.1). Zur Messung der Sauerstoffsättigung im Bulbus jugularis (S_{jvO_2}) wurden Blutproben entnommen und in einem CO-Oxymeter (OSM3-Hemoximeter®, Radiometer Kopenhagen, Dänemark) als Referenzmethode der globalen Verhältnisse gemessen¹³⁹.

4.1.1.2. Ergebnisse

Die Sättigungswerte der CO-oxymetrisch gewonnenen Bulbus-jugularis-Messdaten (S_{jvO_2}) korrelierten stark über einen weiten Sättigungsbereich von 31-83% mit den spektroskopisch bestimmten NIRS-Sättigungswerten (rSO_2) ($r=0,93$; $p<0.001$) (Abbildung 4.1.2) ¹³⁹.

Keine signifikante Korrelation wurde zwischen den rSO_2 -Werten und der arteriellen Sauerstoffsättigung in der Aorta descendens sowie den Sättigungswerten der Pulsoxymetrie gefunden.

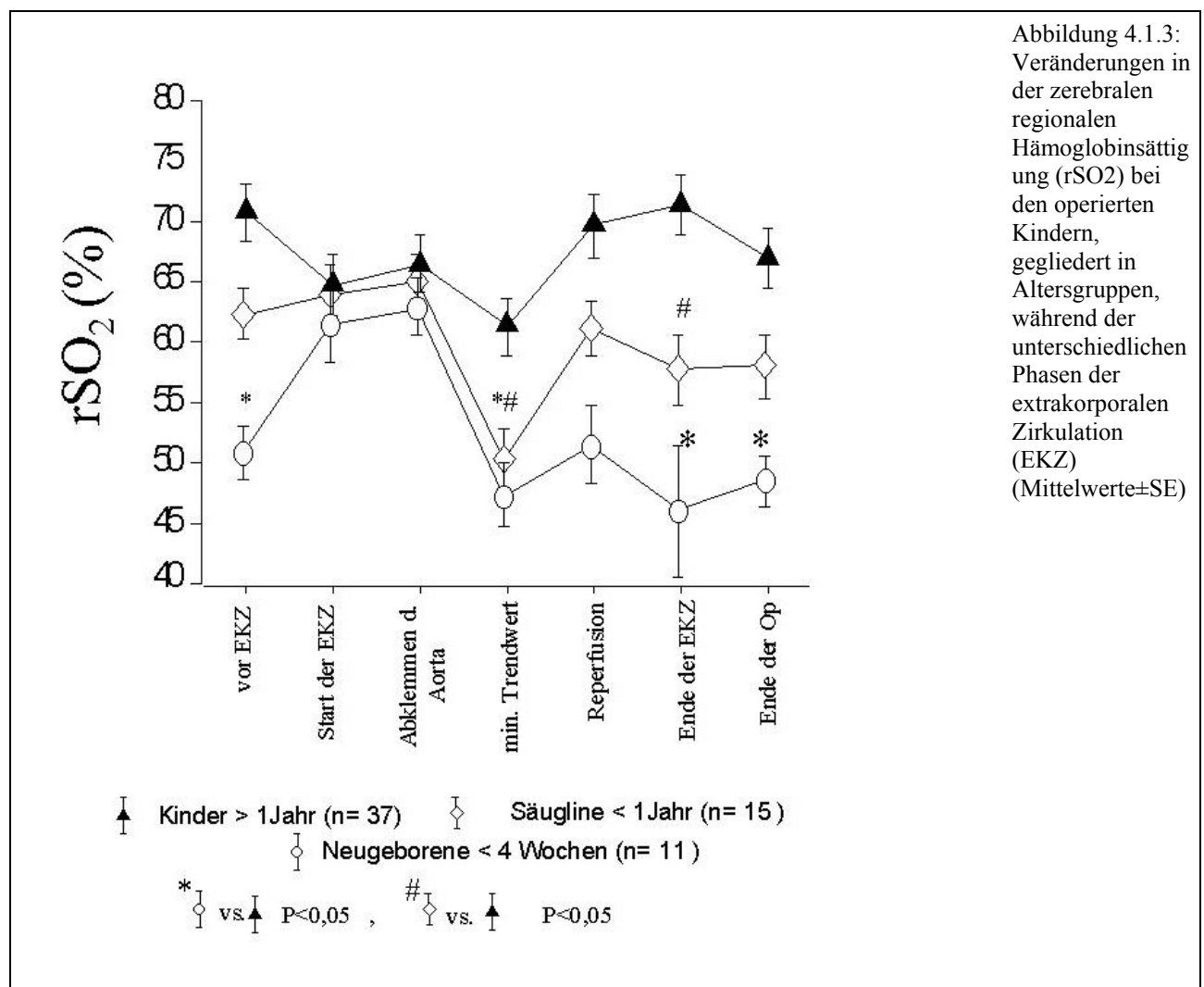


4.1.2. Intraoperatives Monitoring der regionalen Hämoglobinsättigung

Während Korrekturoperationen mit Hilfe der EKZ sollte die Veränderung in der regionalen zerebralen Hämoglobinsättigung (rSO_2) kontinuierlich online registriert werden und die erfassten Veränderungen abhängig von der Art des Vitiums, dem Alter, dem Perfusionsmodus sowie dem Grad der Hypothermie untersucht werden. Zur statistischen Auswertung der Veränderungen in rSO_2 sowie in den simultan erhobenen hämodynamischen Parametern, wie rektale Temperatur, mittlerer arterieller Druck, und Hämoglobinkonzentration, wurden charakteristische OP-Phasen während der extrakorporalen Zirkulation (EKZ) ausgewählt und durch repräsentative Werte dargestellt. Für jede der charakteristischen OP-Phasen wurde der Mittelwert einer 5-minütigen kontinuierlichen Registrierung zur weiteren statistischen Auswertung ermittelt. Der minimale Wert in der Verlaufskurve der rSO_2 wurde nach Abklemmen der Aorta während der EKZ als Trendwert definiert (Abbildung 4.1.3).

4.1.3. Einfluss intraoperativer Faktoren auf den Verlauf der rSO₂

Nach Beginn der EKZ war ein signifikanter prompter Anstieg ($p=0,018$) der rSO₂ bei den überwiegend zyanotischen Kindern und Neugeborenen zu verzeichnen, während sie bei den nicht-zyanotischen Kindern langsamer, aber stetig abfiel ($p=0,007$) (Abbildung 4.1.3). Nach Abklemmen der Aorta näherten sich die Werte der rSO₂ in den drei Patientengruppen einander an, so dass sich in dieser Operationsphase kein statistisch nachweisbarer Unterschied feststellen ließ (Abbildung 4.1.3). Diese Parameter fielen im Verlauf der EKZ bei allen Gruppen auf niedrigere Sättigungswerte ab (Abbildung 4.1.3). Bei tief bis moderat hypothermer EKZ hatten die Neugeborenen und Säuglinge mit 48% den niedrigsten Trendwert und unterschieden sich signifikant von den älteren Kindern, die überwiegend normotherm operiert wurden Während der Reperfusion stieg die rSO₂ in den Gruppen unterschiedlich stark an und es zeigte sich nach Beendigung der EKZ ein persistierender signifikant niedriger Trend in der Gruppe der Neugeborenen, die tief-hypotherm operiert worden waren.



4.1.4. Einfluss der modifizierten Ultrafiltration auf die postoperativen Werte der rSO₂

Die modifizierte Ultrafiltration wurde nach der von Naik und Elliot eingeführten Methode gehandhabt und diente dem Entzug von möglichst viel überflüssigem Wasser aus dem Systemkreislauf nach Ende der Operation^{78,79}. Der Einfluss des Entzugs von akkumuliertem Wasser auf rSO₂ unmittelbar nach der Operation ist unklar.

4.1.4.1. modifizierte Ultrafiltration (MUF)

Nach Ende der EKZ wurde die Aortenkanüle in situ belassen. Das arterielle Blut wurde dann über eine Rollerpumpe durch einen Hämokonzentrator mit einer bestimmten Flussrate von 10-30 ml/kg/min perfundiert (DHF 02, Dideco, Italy). Das konzentrierte Blut wurde dann über eine erwärmte Leitung (Hot-Line) in den Patienten retransfundiert. Die regionale zerebrale Hämoglobinsättigung sowie die hämodynamischen Parameter wurden während der extrakorporalen Zirkulation sowie vor und nach der MUF kontinuierlich simultan gemessen.

4.1.4.2. Ergebnisse

Die Veränderung der rSO₂ während der EKZ waren ähnlich den vorausgegangenen Ergebnissen (s. 4.1.3). Während der MUF zeigte sich in einzelnen Fällen ein transienter leichter Anstieg der rSO₂. Trotz einer gewissen Verbesserung des Hämatokrits zeigte sich nach Ende der MUF keine signifikante Verbesserung des rSO₂-Verlaufs im Vergleich mit der Gruppe der Kinder ohne MUF (Abbildung 4.1.4).

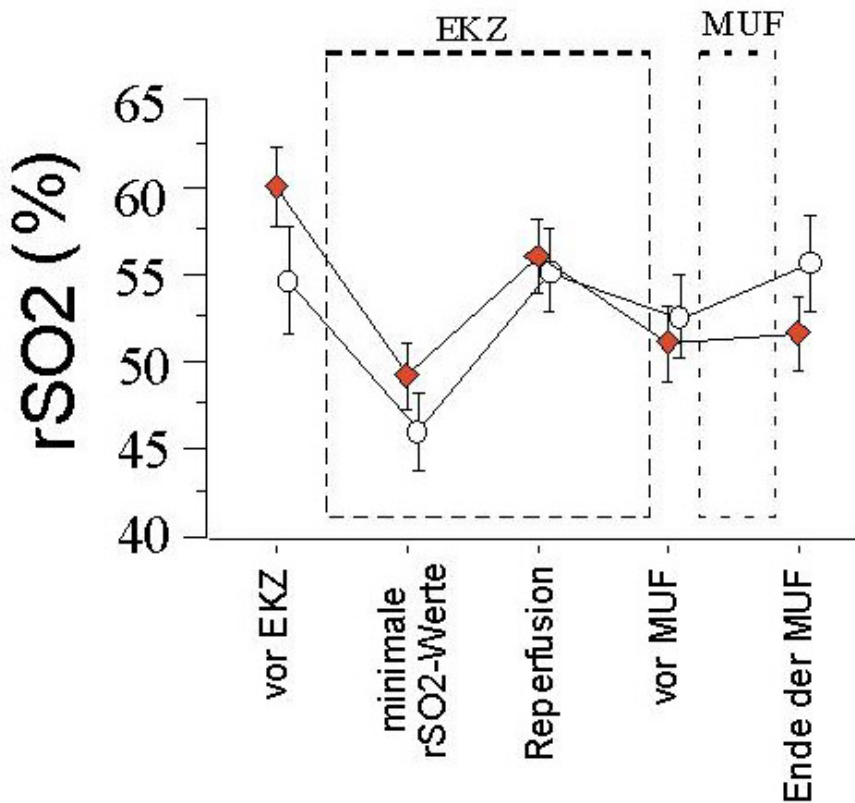


Abbildung 4.1.4: Die rSO₂-Trendwerte vor und nach modifizierter Ultra-filtration (MUF). Die rSO₂-Werte in der Gruppe mit MUF unterschieden sich nicht signifikant von denen ohne MUF. Die MUF scheint keinen unmittelbaren Einfluss auf die Veränderung in der rSO₂ nach standardisierten Operationen mit Hilfe der EKZ zu haben.

4.2. Veränderung der rSO₂ während der postoperativen Phase

Auch die postoperative Phase nach der EKZ stellt ein Risiko für die Beeinträchtigung der Verfügbarkeit von Sauerstoff auf zerebraler Ebene dar. In wie weit die rSO₂ eine Information über diesen Zustand liefert, ist unklar. Daher war das Ziel bei einer Untersuchung auf der Intensivstation, Veränderungen der rSO₂ in Abhängigkeit vom Alter, Modus der Operation und Grad der Hypothermie bei Neugeborenen und Kleinkindern zu evaluieren.

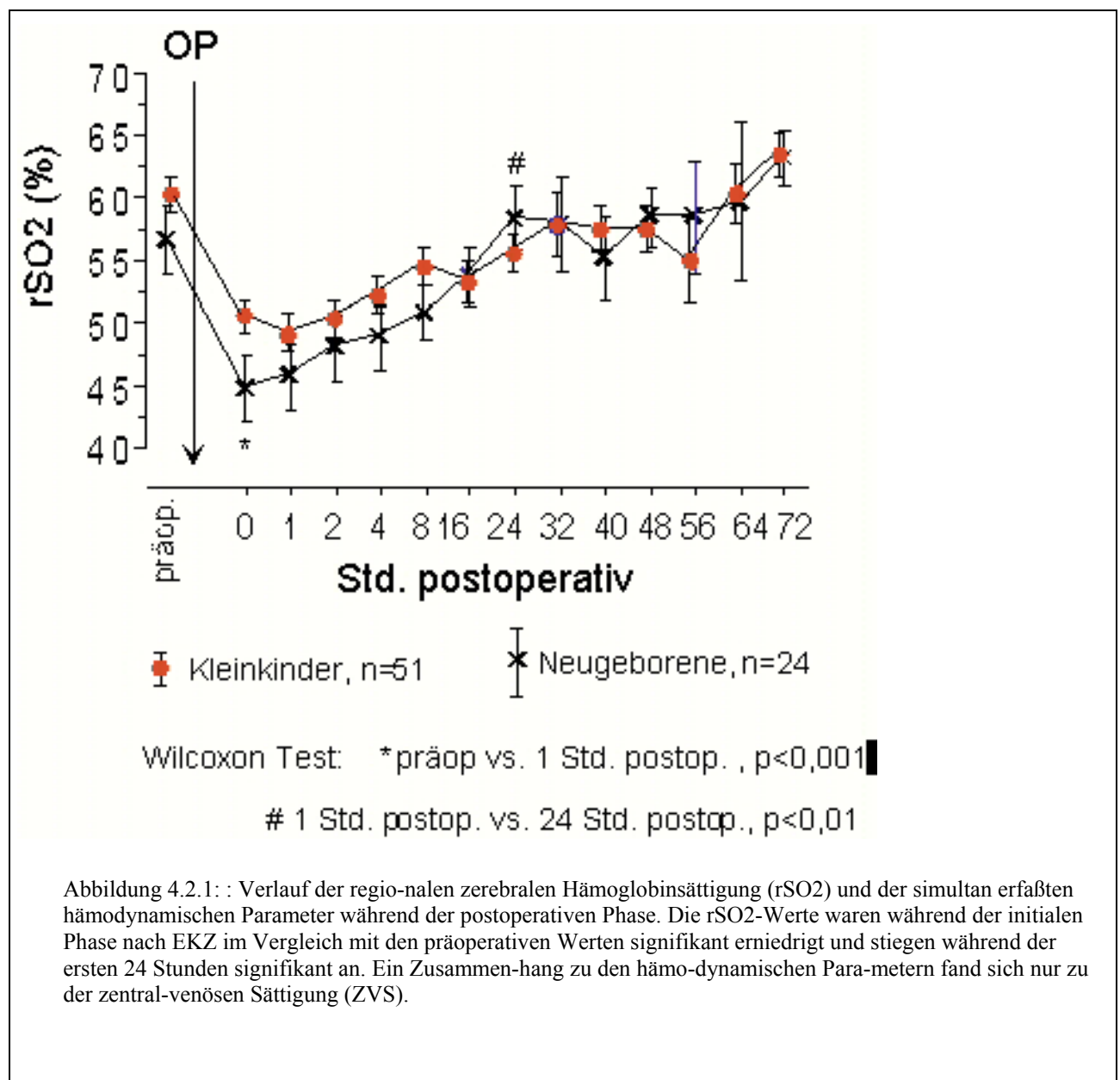
4.2.1. Methodik:

Es wurden 75 Kinder, davon 24 Neugeborene (medianes Alter 8 (3-21) Tage) und 51 Kleinkinder (medianes Alter 15,5 (1-63) Monate) mit zyanotischen und nicht-zyanotischen Herzfehlern in den ersten 72 Stunden nach der operativen Korrektur durch eine kontinuierliche Registrierung der rSO₂ mit Hilfe des Zerebraloxymeters INVOS 3100A (INVOS 3100A[®], Somanetics Corp., Troy, MI,

USA) untersucht. Die üblichen hämodynamischen Parameter und arteriellen Blutgase wurden simultan dokumentiert. Alle herzchirurgischen Eingriffe wurden mit Hilfe einer EKZ in tiefer bis moderater Hypothermie vorgenommen.

4.2.2. Ergebnisse

Es wurden signifikant erniedrigte rSO₂-Werte bei allen Kindern während der ersten 24 Stunden postoperativ gefunden. Neugeborene zeigten niedrigere Werte (rSO₂: 45,2 ±12,8) als ältere Kinder (rSO₂: 50±9,8). Die rSO₂-Werte stiegen während der ersten 8 bzw. 24 Stunden bei allen Kindern signifikant an (Abbildung 4.2.1). Die rSO₂-Werte korrelierten mit der simultan seriell gemessenen venösen Sättigung im rechten Atrium (r=0,46, p=0,0001).



4.2.3. Messung der intrazellulären Oxygenation

Zusätzlich zur Erfassung von Veränderungen in der Oxygenation auf zerebral-intravaskulärer Ebene ist die Evaluierung von Veränderungen im Sauerstoffmetabolismus auf zellulärer mitochondrialer Ebene von klinischer Bedeutung. Ein intrazelluläres Chromophob, das im Zusammenhang mit dem Sauerstoffmetabolismus steht, ist die Cytochromoxydase aa3 (Cyt.Ox aa3), das letzte Enzym der mitochondrialen Atmungskette^{137,140-143}. Das zweite eingesetzte Gerät in unseren Studien (Criticon 2020, Johnson-Johnson, England) hat eine erweiterte Funktion und ist in der Lage, Veränderungen im Oxidations- bzw. Reduktionszustand der Cyt.Ox aa3 auf zellulärer Ebene zu erfassen. Veränderungen im Redoxzustand der Cyt.Ox aa3, macht zu ca 90% der zelluläre Sauerstoffutilisation im aeroben Sauerstoffmetabolismus¹⁴⁴⁻¹⁴⁹.

Eine enge signifikante Korrelation fand sich zwischen dem Abfall des Cyt.Ox aa3-Signals und dem simultanen Verlust des Signals der Energieträger Adenosintriphosphat (ATP) und Phosphocreatinin (PC), gemessen mit *31P-labeled magnetic resonance spectroscopy* in einem Hypoxiemodell am neonatalen Schwein¹⁴⁴.

Das eingesetzte Criticon-Zerebraloxymeter besteht aus einem Hochleistungsprozessor, welcher die Lichtquelle kontrolliert, und 4 Laser-Dioden, die das Licht mit 4 Wellenlängen von 776.5, 819.0, 871.4 und 908.7 nm durch Haut, Knochen und Hirngewebe transportieren. Neben der kontinuierlichen Registrierung der regionalen Hämoglobinsättigung und der einzelnen Verläufe des oxygenierten (HbO₂) und des deoxygenierten Hämoglobins (Hb) kann eine Abweichung im Redoxzustand der mitochondrialen Cyt.Ox aa3 von einer geeichten Nulllinie kontinuierlich gemessen werden.

Die Zuverlässigkeit der Erfassung von Veränderungen in der zellulären Oxygenation mittels kontinuierlicher Messung des Cyt.Ox aa3-Signals mit NIRS in physiologischen und nicht-physiologischen Zuständen wurde bereits von der Arbeitsgruppe um Delpy und Wyatt in London durch mehrere experimentelle und klinische Arbeiten eingehend validisiert^{142,146,150-152}.

4.2.4. Zusammenhang zwischen intravaskulärer und intrazellulärer Oxygenation

Durch intakte zerebrovaskuläre Autoregulation ist die Versorgung der Hirnzellen mit Sauerstoff, trotz einer gewissen intravaskulären Schwankung in Blutvolumen und Perfusionsdruck, gewährleistet^{140,142,153}. Hirnzellhypoxie ist daher anzunehmen, wenn die Sauerstoffverfügbarkeit auf zellulärer Ebene signifikant beeinträchtigt ist¹⁴².

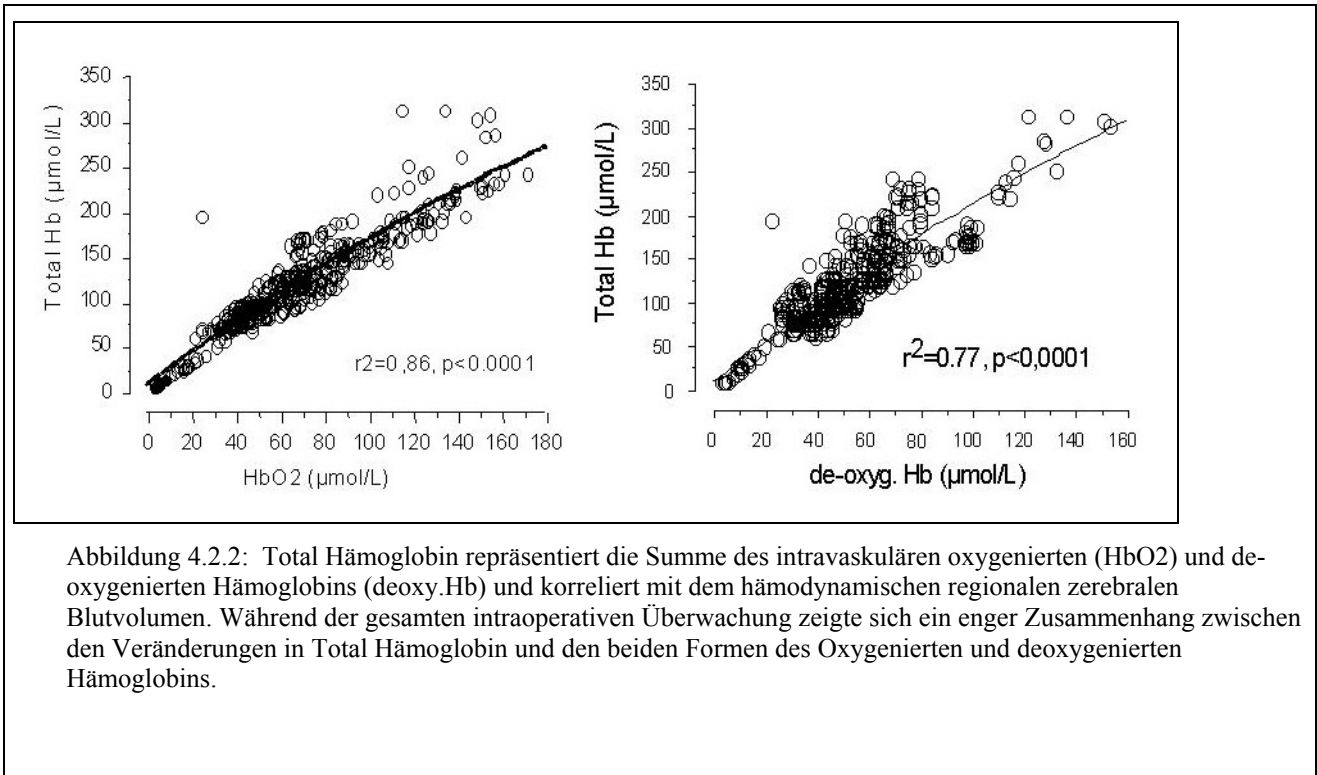
Das Ausmaß der abnehmenden Veränderung in der intravaskulären Oxygenation während Korrekturoperationen mit Hilfe der EKZ, das mit einer signifikanten Abnahme des Sauerstoffs auf zellulärer Ebene einhergeht, ist unklar. Daher untersuchten wir in einer Gruppe von 78 Kindern die Zusammenhänge zwischen den Veränderungen in den intrazellulären und intravaskulären Oxygenationsparametern mit Hilfe des Zerebraloxyimeters Criticon 2020.

4.2.4.1. *Methode*

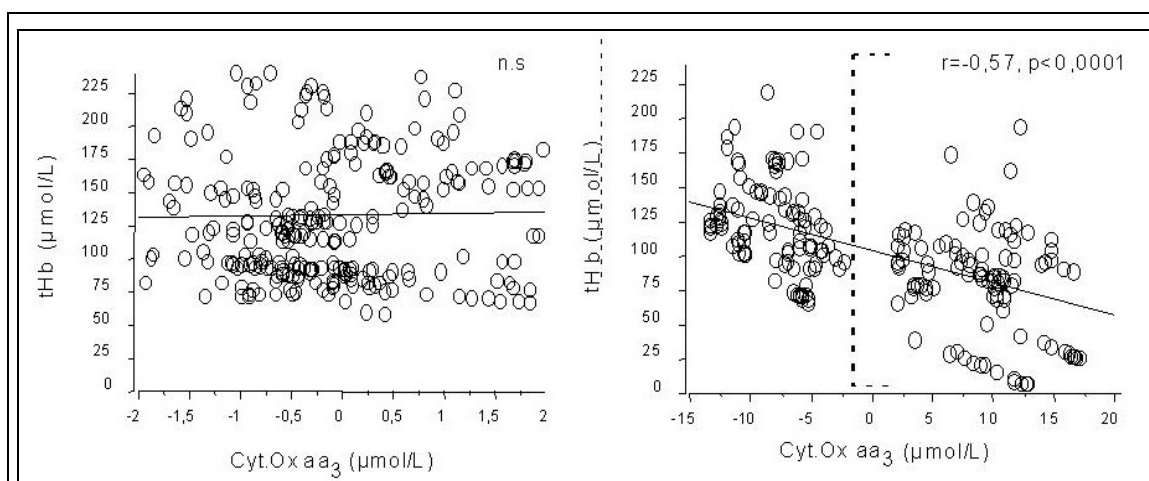
In dieser Studie wurden die kumulativen Überwachungsdaten von 78 Kindern (Neugeborene n=19, Säuglinge n=26, Kleinkinder n=33, Körpergewicht Median 9,5, 3.4-36 Kg) analysiert. Folgende spektroskopische Parameter wurden kontinuierlich von einem Zerebral Redox-Monitor (Criticon-2020) registriert: Veränderungen in den Konzentrationen des oxygenierten Hämoglobins (HbO₂), des deoxygenierten Hämoglobins (Hb), des Total-Hämoglobins (Hbt=Hb+HbO₂) und der intrazellulären mitochondrialen Cytochromoxydase (Cyt.Ox aa3) in µmol/L. Alle Korrekturoperationen wurden mit Hilfe der EKZ unter Normothermie bis tiefer Hypothermie (minimale rektale Temperatur 26±7.5 °C) durchgeführt. Der Hämatokritwert betrug während der EKZ 22.2±2.8%. Die Flussrate der EKZ wurde nach dem Alter und Gewicht dem Herzzeitvolumen angepasst und betrug 120 bis 250 ml/kg/min. Andere hämodynamische Parameter wie Blutdruck, ZVD, und arterielle und venöse Sättigungen wurden simultan registriert. Vollständiger Kreislaufstillstand in tiefer Hypothermie wurde nur bei 17 Kindern (9 Neugeborene und 8 Säuglinge) zu Rekonstruktionen am Aortenbogen, wie es bei dem hypoplastischen Herzsyndrom der Fall ist, eingesetzt. Diese Kinder wurden als separate Gruppe behandelt.

4.2.4.2. *Ergebnisse*

Nach Beginn der EKZ und Abklemmen der Aorta kam es zu einem stetigen Abfall der intravaskulären Oxygenationsparameter wie HbO₂ und Hbt (p=0,001). Die intravaskulären, aber nicht die intrazellulären Oxygenationsparameter waren vom Blutdruck (r=0,36, p=0,001), der Bypassperfusionsrate (r=0,4, p=0,0001) und Grad der Hypothermie (r=0,33, p=0,0001) abhängig. Während des gesamten Untersuchungszeitraums fand sich eine enge Korrelation zwischen dem oxygenierten und deoxygenierten Hämoglobinsignal und dem Totalhämoglobinsignal (HbO₂ vs. Hb, r²=0.86), (HbO₂ vs. tHb, r²=0.93) und (Hb vs. tHb, r²= 0.76).



Die gemessenen Cyt.Ox aa₃-Werte lagen zwischen +23 und -22 µmol/L, die meisten lagen jedoch im Bereich zwischen -1 und +4 µmol/L (Median 0,09). Die Cyt.Ox aa₃-Werte in diesem Bereich (-1 und +4) korrelierten nicht mit den simultanen Schwankungen in HbO₂ und Hb. Abweichungen in Cyt.Ox aa₃ außerhalb dieses Bereichs korrelierten jedoch mit der Veränderung in HbO₂ (Abbildung 4.2.3).



5. Biochemische Marker für die Hirnschädigung nach Korrekturoperationen angeborener Herzfehler

5.1. Protein S-100B

Die S-100-Familie der Ca-bindenden Proteine enthalten 16 Mitglieder mit unterschiedlicher Organexpression und zellulären und extrazellulären Funktionen^{154,155}. Das Protein S-100 wurde bereits 1965 von Moore aus Rinderhirn isoliert und erhielt seinen Namen aufgrund seiner Löslichkeit (Solubility) in 100%igem Ammoniumsulfat¹⁵⁶. Das Protein S-100 ist in drei Isomeren ($\alpha\alpha$ (S-100a₀), $\beta\beta$ (S-100B), $\alpha\beta$ (S-100a)) in verschiedenen Organen und Geweben vorhanden^{155,157}. Das Dimer S-100B hat ein Molekulargewicht von ca. 21 kD und kommt reichlich in den Astrogliazellen des Nervensystems (80%) neben zusätzlich S-100 α (20%) vor^{154,158,159,160,155}. Das Protein S-100B ist zum größten Teil intrazellulär vorhanden, wird jedoch sowohl unter physiologischen als auch nicht-physiologischen Bedingungen in den extrazellulären Raum freigesetzt^{155,161}.

Mehrere Funktionen wurden dem intrazellulären Protein S-100B im Zentralnervensystem durch Identifikation von Zielproteinen zugeschrieben^{155,161,162}. Das Ca⁺⁺-bindende Protein S-100 kann bei der Regulation der intrazellulären Ca⁺⁺-Hämeostase in physiologischen und ischämischen Zuständen eine Rolle spielen^{163,164}. *In Vitro* S-100B triggert den Ca⁺⁺-Einstrom in die PC12 Zellen und induziert dabei einen cytotoxischen Effekt¹⁶⁵. Ähnliche Wirkung *in vivo* wird vermutet¹⁶⁵. Weitere Funktionen wie Hemmung der Phosphorylisation und axonale Proliferation von Microtubuli wurden nachgewiesen^{161,162}. *In vitro* wurde nicht nur ein neuroprotektiver Effekt in niedrigeren Konzentrationen (pM-nM), sondern auch ein toxischer Effekt durch Induktion eines apoptotischen Zelltods der Astrozyten in höheren Konzentrationen (μ M) beobachtet^{166,167,154,164}. Die Apoptoseinduktion durch S-100 *in vitro* wird durch Erhöhung der intrazellulären Ca⁺⁺-Konzentration^{165,167,168} und durch Aktivierung der NO-Synthase vermutet^{166,168}.

Erhöhte S-100B-Konzentrationen wurden im Serum und/oder Liquor bei Patienten mit neurologischen Affektionen und neurodegenerativen Erkrankungen wie Schizophrenie¹⁶⁹, Alzheimer¹⁷⁰, Trisomie 21¹⁷¹, Epilepsie¹⁷², Abdul-Khaliq, 1999 #2666, Creutzfeldt-Jakob-Krankheit¹⁷³, Meningitis¹⁷⁴ und amyotrophische Lateralsklerose gefunden¹⁷⁵. Diese Erkenntnisse in klinischen und experimentellen Studien über das Verhalten des S-100B weisen auf eine wichtige Rolle des Proteins S-100B in physiologischen und pathologischen Prozessen im Zentralnervensystem hin.

Da die Astroglia etwa die Hälfte der Hirnmasse ausmacht und sich nicht auf ein bestimmtes Hirnareal beschränkt, erscheint die Bestimmung eines Zellproteins dieser Zellen von diagnostischer

neurologischer Bedeutung. Der genaue Mechanismus der Freisetzung des Proteins S-100B in die Blutbahn im Zusammenhang mit zerebraler Ischämie während der extrakorporalen Zirkulation ist unklar.

5.1.1. S-100B Serumwerte nach herzchirurgischen Eingriffen im Kleinkindesalter

Die frühzeitige Erkennung von zerebralen Schädigungen durch einen zusätzlichen spezifischen biochemischen Hirnzellmarker könnte von besonderer diagnostischer und prognostischer Bedeutung sein. Mehrere klinische Studien bei Erwachsenen und Kindern wiesen bereits auf die Spezifität und den neurologisch prädiktiven Wert des Protein S-100B nach herzchirurgischen Eingriffen hin ¹⁷⁶⁻¹⁸¹. Andere Studien bei Erwachsenen zweifelten am diagnostischen Wert nach herzchirurgischen Eingriffen wegen möglicher Kontamination der gemessenen Werte mit Protein S-100 aus anderen Quellen, wie Fettzellen, wenn das abgesaugte Blut aus dem Thoraxbereich in den Patienten reperfundiert wird ¹⁸²⁻¹⁸⁴.

Die klinischen und experimentellen Untersuchungen in dieser Arbeit dienten daher der Charakterisierung des Zeitverlaufs der Serumwerte nach EKZ, der Evaluierung von Einflussfaktoren und der Untersuchung der neurologischen Bedeutsamkeit der Bestimmung dieser Hirnmarker nach herzchirurgischen Eingriffen im Kleinkindesalter. Im experimentellen Teil werden die neuropathologischen und immunhistochemischen Zusammenhänge mit dem Nachweis des Proteins S-100B im Serum untersucht.

5.1.2. Methode

An einem größeren Patientenkollektiv sollte im Rahmen der Bestimmung des Proteins S-100B als Screeningmarker für eventuelle zerebrale Schädigung nach den herzchirurgischen Eingriffen das Verlaufsmuster untersucht und definiert werden. In bestimmten Untergruppen von Kindern wurde der Einfluss von Medikamenten, intraoperativen Maßnahmen, und der Zusammenhang zur Veränderung in der zerebralen Perfusion und Oxygenation untersucht.

Tabelle 5.1.1:

Tabelle 5.1. Klinische und demographische Daten der untersuchten Gruppen.

	Abnorme neurolog. Befunde (n = 15)	ISTA (n = 14)	d-TGA (n= 29)	HLHS (n= 12)	VSD (n= 37)	AVSD (n= 30)	ASD (n= 9)	TOF (n=22)
<i>Alter, median, range (min-max) mean \pmSD (Monateh)</i>	0.35 (0.2-48) 6.2 \pm 13.8	3.0 (0.03-7) 1.7 \pm 2.6	0.25 (0.16-1.0) 0.32 \pm 0.17	0.3 (0.1-1.0) 0.34 \pm 0.25	5.7 (1.4-80) 10.1 \pm 14.4	4.0 (0.13-50) 6.5 \pm 9.3	9.2 (0.13-50) 9.6 \pm 4.3	13 (0.75-51) 15.6 \pm 13.1
<i>Stillstandzeit (Minute)</i>	42\pm27 (n=3)			52 \pm 17				
<i>Abklemmzeit (Minute)</i>	69 \pm 47	12 \pm 7	96 \pm 23	53 \pm 32	40 \pm 21	64 \pm 21	21 \pm 32	43 \pm 41
<i>Bypasszeit (Minute)</i>	199 \pm 239		198 \pm 77	181 \pm 92	94 \pm 145	107 \pm 56	42 \pm 52	107 \pm 52
<i>Minimale rektale Temperatur(°C)</i>	21 \pm 8		18 \pm 4	17 \pm 1	31 \pm 5	28 \pm 3	35 \pm 2	28 \pm 4
<i>Präop. Protein S-100 (μg/L)</i>	1.1 \pm 0.5	0.77 \pm 0.73	0.8 \pm 0.4	0.72 \pm 0.31	0.53 \pm 0.32	0.63 \pm 0.4	0.32 \pm 0.4	0.38 \pm 0.24
<i>Postop. Protein S-100 (μg/L)</i>	10.4 \pm 8.7	1.1 \pm 0.8	4.1 \pm 2.27	3.0 \pm 1.2	2.6 \pm 2.5	3.1 \pm 0.4	1.2 \pm 0.7	1.7 \pm 1.0

Abkürzungen :

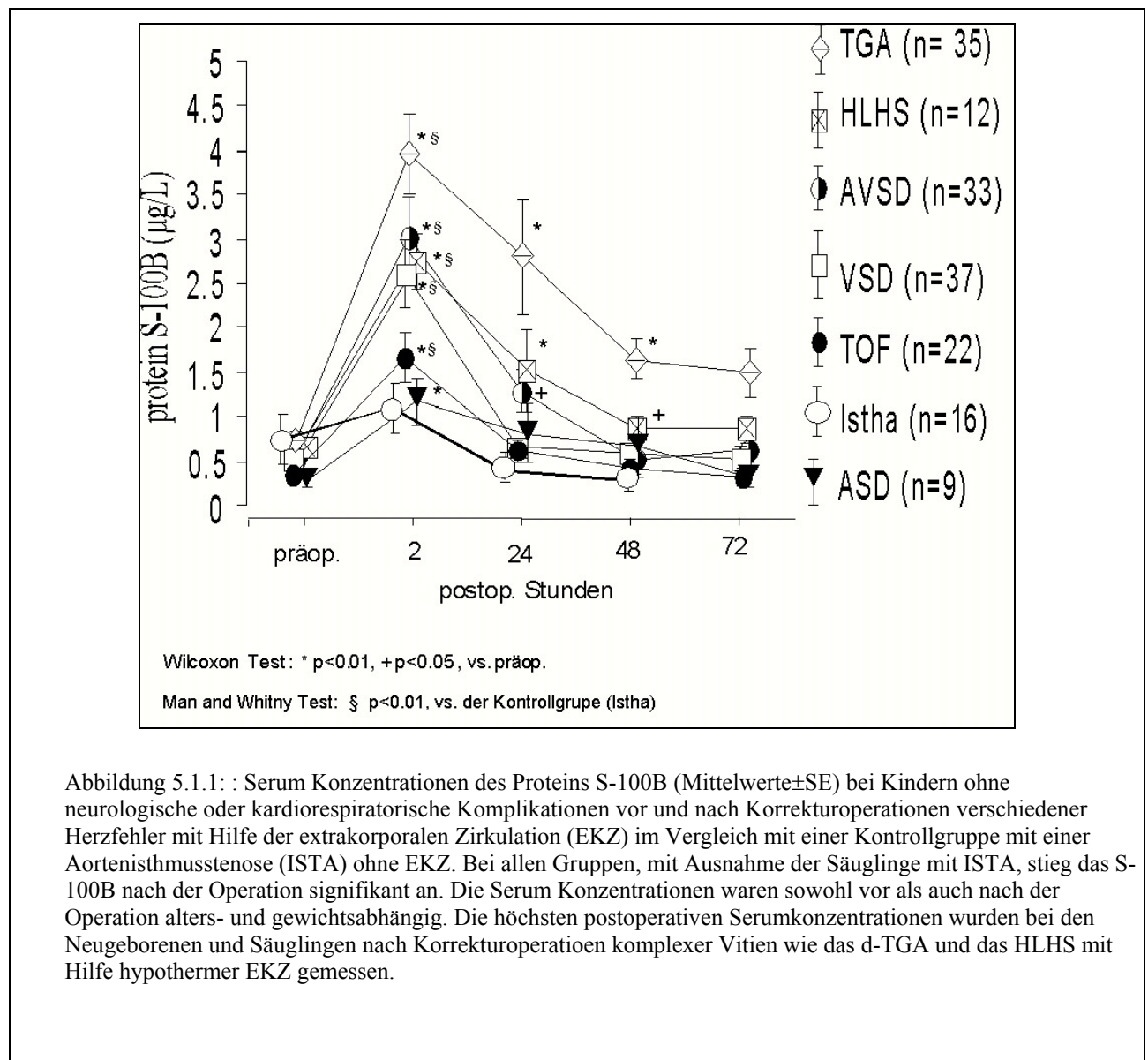
- *. ISTA = Isthmusstenose der Aorta
- *. d-TGA = Transposition der großen Arterien
- *. HLHS = Hypoplastisches Linksherzsyndrom
- *. VSD = Ventrikel Septumdefekt
- *. CAVSD = kompletter atrioventrikulärer Septumdefekt
- *. ASD = Vorhof Septumdefekt
- *. TOF = Fallot,sche Tetralogie

In diese Studie wurden 165 Kinder eingeschlossen. Die Patienten wurden nach den vorgesehenen chirurgischen Maßnahmen in sieben homogene Gruppen unterteilt (Tabelle 5.1.1:). Alle Patienten, mit Ausnahme der Gruppe mit hypoplastischem Linksherzsyndrom, wurden ohne Kreislaufstillstand mit Hilfe der EKZ operiert (Tabelle 5.1.1:). Vierzehn Kinder mit geplanter Korrekturoperation einer Isthmusstenose der Aorta ohne Einsatz der EKZ dienten als Kontrollgruppe (Tabelle 5.1.1:).

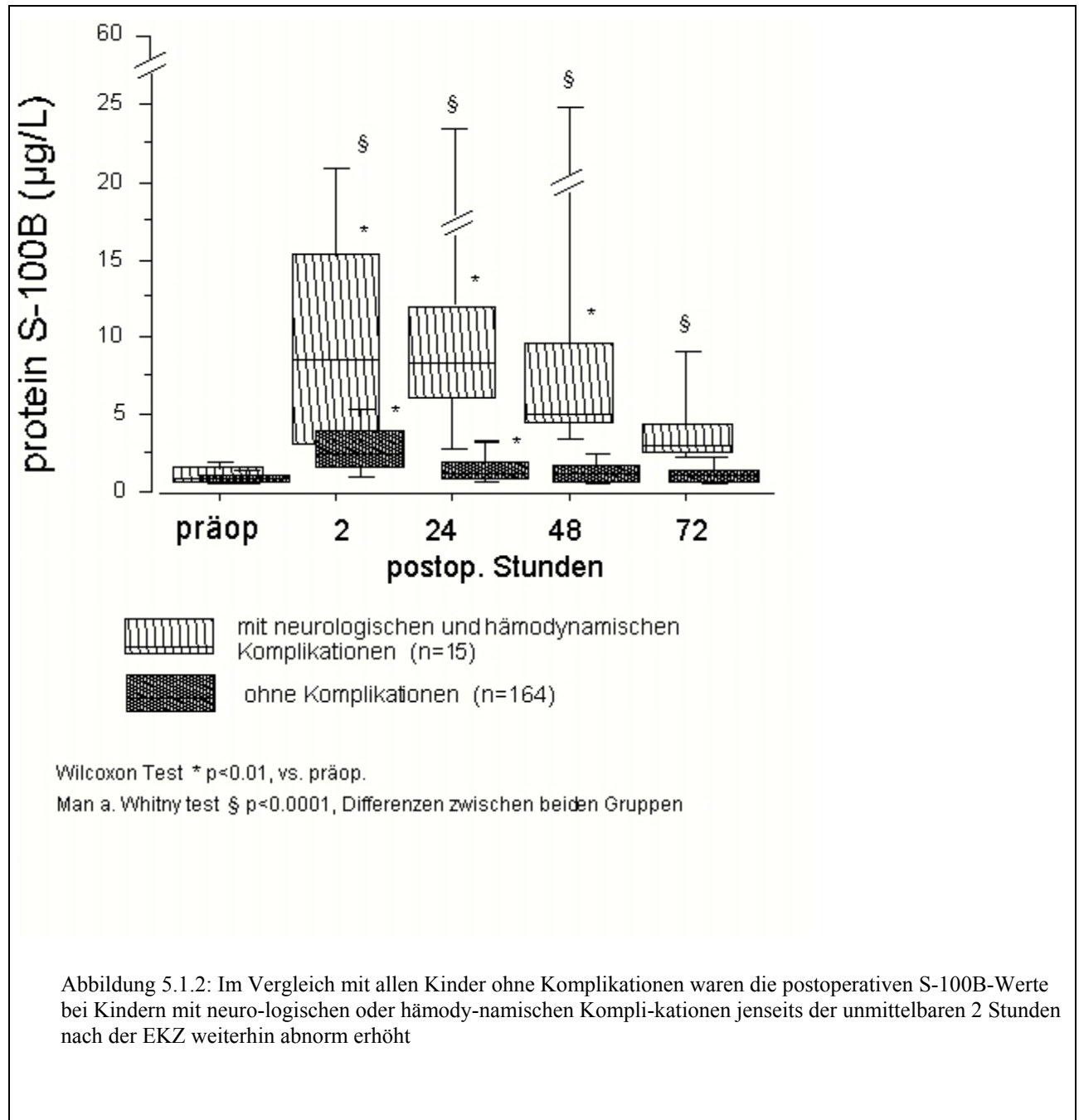
Zwölf Kinder entwickelten während der postoperativen Phase neurologische Komplikationen im Zusammenhang mit dem chirurgischen Procedere unterschiedlicher Art und wurden in eine separate Gruppe eingeschlossen (Tabelle 5.1.1). Bei diesen Kindern sollte das Verlaufsmuster des Proteins S-100B in Gegenüberstellung zu dem der Kinder ohne neurologische Komplikationen verglichen werden. Die Blutentnahmen erfolgten vor der Operation, 2, 24, 48, 72 Stunden nach Ende der EKZ. Das Serumprotein S-100B wurde mit Hilfe eines LIA Kitts (Byk-Sangtec[®], Dietzenbach, Deutschland) gemessen. Alle Kinder wurden, mit Ausnahme der Säuglinge mit einer ISTA, mit Hilfe der extrakorporalen Zirkulation in tiefer Hypothermie bis Normothermie je nach Alter und Art des angeborenen Herzfehlers operiert (Tabelle 5.1.1). Die Regulation des Säure-Basen-Haushaltes erfolgte nach der Alpha-Stat-Methode, bei der pCO₂ und pH unkorrigiert für die absinkende Temperatur während der extrakorporalen Zirkulation gehalten werden.

5.1.3. Ergebnisse

Die präoperativen Werte waren gewichts- ($r = -0.46$, $p = 0.007$) und altersabhängig ($r = -0.46$, $p = 0.004$). Im Gegensatz zur Kontrollgruppe mit einer Isthmusstenose zeigte sich bei allen Kindern nach Korrekturoperationen mit Hilfe der EKZ ein signifikanter Anstieg der S-100B-Konzentrationen unmittelbar nach Ende der Operation (Abbildung 5.1.1). Die höchsten postoperativen Serumwerte des Proteins S-100B wurden bei Neonaten nach Korrekturoperationen komplexer Vitien wie der d-Transposition der großen Arterien und dem hypoplastischen Linksherzsyndrom, die längeren Bypasszeiten und tieferen Temperaturen unterzogen wurden, gefunden (Abbildung 5.1.1, Tabelle 5.1.1). Die postoperativen Werte korrelierten mit dem Alter ($r = -0.55$, $p = 0.0003$), Gewicht ($r = -0.54$, $p = 0.0003$), Bypasszeit ($r = 0.52$, $p = 0.0006$) und der mit minimalen rektalen Temperatur während der EKZ ($r = -0.63$, $p = 0.0003$).



Die Multiregressionsanalyse identifizierte jedoch die minimale rektale Temperatur während der EKZ als den größten unabhängigen Faktor, der die postoperative Serumkonzentration signifikant beeinflusst ($p < 0.001$)¹⁷⁷. Abnorm höhere postoperative Serumwerte des Proteins S-100B wurden bei Kindern mit nachgewiesenen neurologischen und hämodynamischen Komplikationen im Zusammenhang mit der Operation und dem Anschluß an der EKZ gefunden (Abbildung 5.1.2).¹⁷⁷



5.2. Zusammenhang zur Veränderung der zerebralen Oxygenation

Der Pathomechanismus neurologischer Morbidität und Beeinträchtigung der psychomotorischen Entwicklung nach herzchirurgischen Eingriffen bei Kindern scheint multifaktoriell zu sein und überwiegend auf globalen oder fokalen hypoxisch-ischämischen Ereignissen während und nach der extrakorporalen Zirkulation zu beruhen^{122,176,185,186}. Alterationen des Sauerstoffmetabolismus auf intravaskulärer und interzellulärer zerebraler Ebene scheinen zu diesen Schädigungen beizutragen^{30,122,186}.

Daher war das Ziel dieser Studie, Zusammenhänge zwischen Konzentration des postoperativen Serumprotein S-100 und möglichen Alterationen der zerebralen Oxygenation während verschiedener Operationsphasen herzchirurgischer Eingriffe im Kindesalter zu untersuchen.

5.2.1. Patienten und Methoden

In dieser Studie wurden 63 Kinder im Alter von 0,2 bis 216 Monaten untersucht und entsprechend dem Operationsalter in drei Gruppen unterteilt (Tabelle 5.2.1). Die kontinuierliche Registrierung der regionalen zerebralen Hämoglobinsättigung wurde mit einem Zerebraloxymeter (INVOS 3100A, Somanetics[®], USA) vorgenommen. Bei allen Kindern wurden intraoperativ nach der Einleitung der Narkose, vor dem Start und nach Beendigung der extrakorporalen Zirkulation, am Ende der Operation Blutproben entnommen und unmittelbar danach zentrifugiert und eingefroren.

Tabelle 5.2.1: Demographische Daten

	tiefe Hypothermie (n = 10)	moderate Hypothermie (n= 40)	Normothermie (n=18)
Alter (Monaten)	1 (0.2-5) 1.9±1	4 (0.14-207) 60±150	4.5 (1-238) 79±159
Gewicht (Kg)	4.8±2.4	6.2±3.3	9±5
Bypasszeit (Minuten)	229±111	113±64	50±34
Minimale rektale Temperatur (°C)	17.8±3.6	29.1±2	35.6±0.6
Aortenklemmzeit (Minuten)	87±32	54 ±21	17±9
Präoperative SO ₂ (%)	85±9	92±7	95±8

5.2.2. Ergebnisse

Bei allen Kindern konnte schon vor dem Start der extrakorporalen Zirkulation S-100 im Serum nachgewiesen werden (Tabelle 5.2.1). Nach der Operation stiegen die S-100-Serumwerte um zwei Standardabweichungen vom präoperativen Wert signifikant an. Der Spearman-Rank-Korrelationstest zeigte einen statistischen Zusammenhang zwischen den postoperativ erhöhten S-100-Serumwerten und der Erniedrigung der regionalen zerebralen Hämoglobinsättigung in der Reperfusionsphase ($r=-0,37$, $p=0,02$) und am Ende der extrakorporalen Zirkulation ($r=-0,42$, $p=0,008$) (Abb. 5.2-1). Die statistische Beziehung zum Abfall der zerebralen Oxygenation am Ende der Operation war nicht signifikant ($r=-0,29$, $p=0,08$). Ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen den maximal postoperativen S-100B-Werten und der regionalen zerebralen Hämoglobinsättigung in den übrigen Phasen der extrakorporalen Zirkulation war nicht nachweisbar.

5.3. Zusammenhang zum Sauerstoffradikalmetabolismus

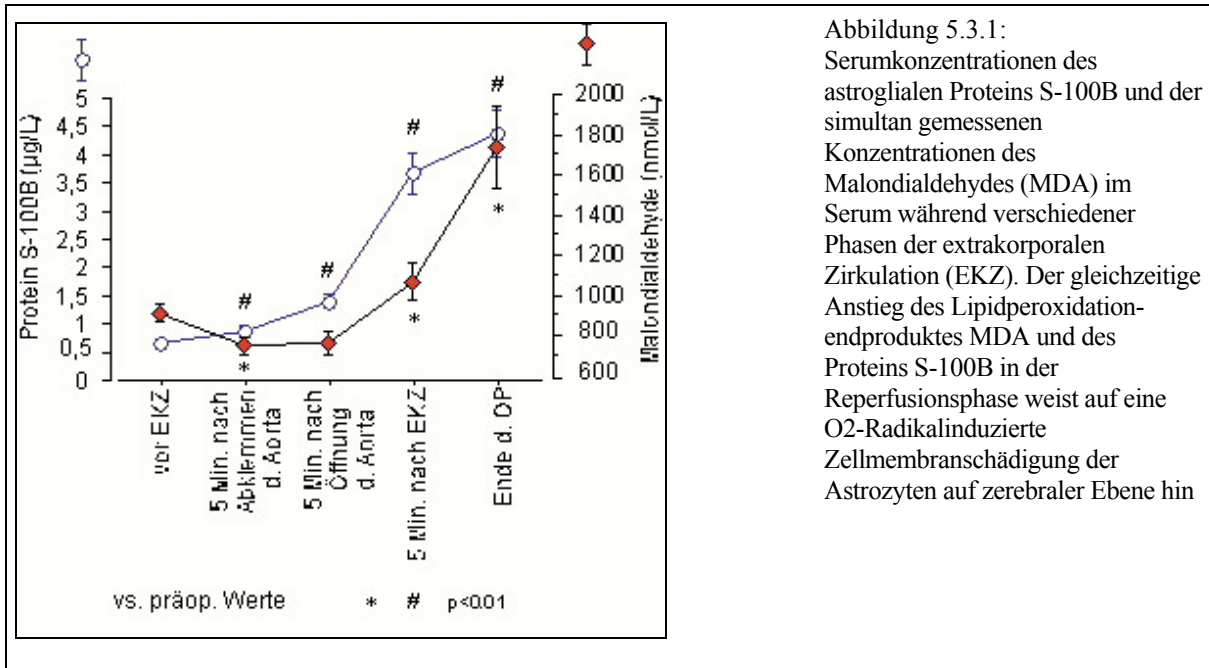
Der Anschluss des Kreislaufs an die EKZ mit Schwankungen in der systemischen Oxygenation und Perfusion führt zur globalen Sauerstoffradikalinduzierten Lipidperoxidation im Gewebe und zum Verbrauch der eigenen antioxidativen Reserven¹⁸⁷⁻¹⁸⁹. Die resultierenden nicht-physiologischen Veränderungen in der zerebralen Perfusion und Oxygenation könnten ebenfalls eine Lipidperoxidation auf zerebral-vaskulärer Ebene begünstigen^{31,187,190}. Ob die Freisetzung des Astrogliazell-Proteinmarkers S-100B durch Membranschädigung des astroglialen Zellkomplexes, der die Blut-Hirnschranke bildet, zustandekommt, ist unklar. Malondialdehyd (MDA) ist ein Abbauprodukt der O₂-Radikal-induzierten Phospholipidperoxidation in der Zellmembran und kann im Serum bestimmt werden. In dieser Studie wurde die Kinetik des MDA in Beziehung zum Serumspiegel des Proteins S-100 in dem zerebral-venösen Blut aus der Vena jugularis interna während und nach EKZ untersucht⁴².

5.3.1. Methode

Bei 56 Kindern (Neugeborene $n=7$, Säuglinge $n=16$, und Kleinkinder $n=23$) wurden serielle Blutproben über einen Jugularis-Katheter zu bestimmten Zeitpunkten der EKZ entnommen und sofort bei 2 °C mit einer Kühlzentrifuge im Operationssaal zentrifugiert und bei -70 °C eingefroren. Die Kinder wurden alle mit Hilfe der EKZ (140-200/kg/min) in tiefer bis moderater Hypothermie (15-34 °C) operiert. Für die Bestimmung von Malondialdehyd werden 100 µl Serum, 750 µl von 150 µM Phosphorsäure, 250 µl von 42 µM Thiobarbitalsäure und 400 µl gereinigtes Wasser zusammengegeben und für eine Stunde im Wasserbad gekocht. Die Reaktion wird durch

Überführen der Proben auf Eis gestoppt. Direkt im Anschluss wird die Malondialdehyd-Konzentration durch hochauflösende Flüssigkeitschromatographie bestimmt (Fluorometric Detector RF-10A, Column Supercosil 150x4 mm LC-18-S; Shimadzu, Duisburg, Germany).

5.3.2. Ergebnisse



Es zeigte sich eine kontinuierliche parallele Erhöhung beider Marker während der EKZ. Der größte relative Anstieg von S-100 (67%) und MDA (85%) fand jedoch nach Öffnung der Aorta in der Reperusionsphase und nach Ende der EKZ ($P<0.001$) statt (Abbildung 5.3.1)

Die Abklemmzeit der Aorta ($r=0,46$, $p=0,004$) und der Grad der Hypothermie ($r=-0,42$, $p=0,007$) hatten den größten Einfluss auf die maximalen MDA-Werte. Die maximalen S-100-Werte korrelierten signifikant zur Bypasszeit ($r=0,70$, $p=0,0007$), Abklemmzeit der Aorta ($r=0,57$, $p=0,002$), Tiefe der Hypothermie ($r=-0,58$, $p=0,004$) und waren signifikant alters- und gewichtsabhängig ($p<0,001$).

Tabelle 5.3.1:

	Neugeborene (n = 11)	Säuglinge (n= 37)	Kinder >1Jahr (n=15)
Alter (Monaten) Median, Mittelwert \pm SD	0,3 (0.2-5) 0,38 \pm 0,27	4,0 (1,5-12) 4,8 \pm 2,6	34 (12-216) 89 \pm 104
Zeit zum Erreichen der minimalen regionalen Hämoglobinsättigung (Minute)	131 \pm 112	38 \pm 32	23 \pm 20
Bypasszeit (Minute)	204 \pm 143	113 \pm 64	78 \pm 34
Minimale rektale Temperature (°C)	23 \pm 5,6	29,7 \pm 5,7	35.6 \pm 0.6
Aortenklemmzeit(Minute)	74 \pm 34	52 \pm 28	17 \pm 9
Präoperative SO2 (%)	87 \pm 5	93 \pm 8	98 \pm 5
Präop. Protein S-100 (µg/L)	1,1 \pm 0,7	0,65 \pm 0,4	0,33 \pm 0,14
Postop. Protein S-100 (µg/L)	3,7 \pm 1,7	2,1 \pm 1,18	1,4 \pm 0,75
Diagnosen	d-TGA (n=7), TAPVD (n=2) IAA (n=2)	AVSD (n=7) VSD (n=6) PA (n=5) TOF (n=4) d-TGA (n=3) TAC (n=2) DORV (n=2) andere (n=8)	PAPVD (n=2) TOF (n=5) ASD (n=4) DORV (n=1) andere (n=3)

- *.d-TGA = Transposition der großen Arterien in d-Stellung
- *.PA = Pulmonalatresie
- *.TAPVD = Totale Lungenvenenfehleimündung
- *.AVSD = Atrioventrikulärer Septumdefekt
- *.TOF = Fallotsche Tetralogie
- *.VSD = Ventrikelseptumdefekt
- *.PAPVD= Partielle Lungenvenenfehleimündung
- *.DORV= Double Outlet Right Ventricle
- *.ASD= Vorhofseptumdefekt
- *.IAA= Unterbrochener Aortenbogen

5.4. Einfluss der intraoperativen Medikation mit Natrium Nitroprussid auf die postoperativen Serumwerte des S-100B

Die Bildung von Sauerstoffradikalen und die folgende radikalinduzierte Membranzellschädigung ist möglicherweise eine von mehreren Pathomechanismen, die die Integrität der Astrozyten und Endothelzellen nach EKZ beeinflussen^{13,27,30 191,192}. Die Membranzellschädigung des Endothel und der astrozytären Zellen, welche die anatomische und funktionelle Schranke zwischen Blut und Hirnzellen bilden, könnte den Nachweis des Proteins S-100B im Serum erklären⁴².

Natrium Nitroprussid ist ein NO-Spender, der durch Entfaltung seiner Wirkung in den Endothelzellen zu einer Vasodilatation in den Arteriolen und somit zur Verbesserung der Gewebepерfusion führt. Es wird häufig während und nach der EKZ als Nachlastsenker auch bei Neugeborenen eingesetzt. In experimentellen Arbeiten wurde ein direkter protektiver Effekt des Natrium-Nitroprussids auf die Astrozyten und Endothelzellen nach Ischämie-Reperfusion nachgewiesen¹⁹³⁻¹⁹⁶. In diesem Zusammenhang führten wir eine prospektive Studie zur Evaluierung des Effektes einer intra- und postoperativen kontinuierlichen Gabe von Natrium-Nitroprussid auf zerebraler Ebene durch eine serielle Bestimmung des astroglialen Proteins S-100B im Serum durch¹⁹⁷.

5.4.1. Methode

201 Kinder mit angeborenen Herzfehlern wurden vor einem herzchirurgischen Eingriff in zwei Gruppen (mit und ohne Behandlung mit Natrium Nitroprussid) randomisiert. Eine Natrium-Nitroprussid-Infusion wurde bei der behandelten Gruppe (n=99) vor dem Start der EKZ mit geringer Dosierung begonnen und kontinuierlich nach adaptierter Dosierung bis 48 Stunden postoperativ fortgeführt. Das Protein S-100B wurde vor der Operation, 2 Stunden postoperativ und weiterhin täglich bis zum 3. postoperativen Tag bestimmt.

5.4.2. Ergebnisse

Wie in der vorherigen Studie zeigte sich ein signifikanter Anstieg der Serumwerte des Proteins S-100B zwei Stunden nach Ende der EKZ. 24 Stunden nach Ende der EKZ fielen die Serumwerte in beiden Gruppen ab. Diese späteren Werte waren jedoch bei den mit Natrium Nitroprussid behandelten Kindern signifikant niedriger ($p < 0.001$) (Abbildung 5.4.1).

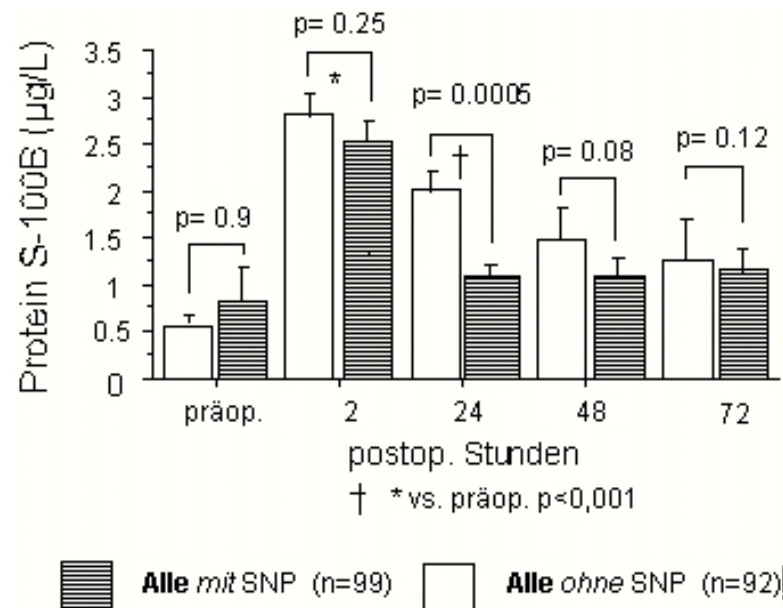


Abbildung 5.4.1: Die kontinuierliche Behandlung mit niedrig konzentrierter Infusion Natrium Nitroprussid (SNP) (1-5 µg/kg/min) scheint die Freisetzung des Proteins S-100B aus den Astrozyten zu hemmen. Eine protektiver Effekt an den Astrozyten-Endothelzellkomplex der Blut-Hirnschranke ist anzunehmen

5.5. Einfluss der modifizierten Ultrafiltration auf die postoperativen Werte des S-100B

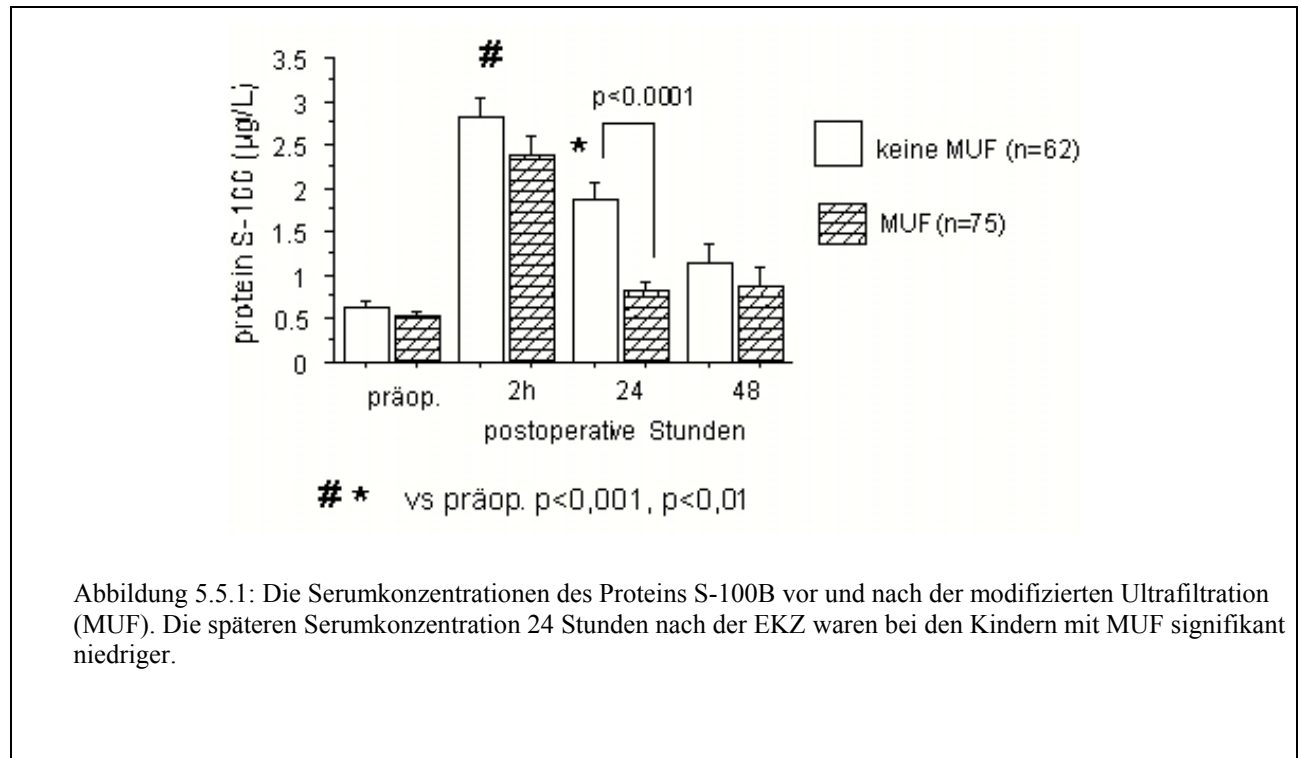
Die Vorteile der modifizierten Ultrafiltration (MUF) am Ende der extrakorporalen Zirkulation nach herzchirurgischen Eingriffen bei Kindern und Erwachsenen wird neun Jahre nach Einführung der Methode kontrovers diskutiert^{198,199 200-203}. Zusätzlich zum Entzug von akkumuliertem Wasser im Gewebe durch die MUF werden inflammatorische Mediatoren und verschiedene Noxen, die während der EKZ freigesetzt werden, eliminiert^{204,205}. Wie bereits im Abschnitt 4.1.2 gezeigt wurde, haben wir keinen unmittelbaren Einfluss der MUF auf die zerebrale Perfusion und Oxygenation festgestellt. Ein hämodynamischer und respiratorischer positiver Effekt wurde innerhalb der postoperativen Intensivphase beobachtet^{200,201}. In dieser Studie sollte der Einfluss der MUF auf die Kinetik des Proteins S-100 untersucht werden.

5.5.1. Modifizierte Ultrafiltration (siehe 4.1.2)

Bei 137 Kinder mit medianem Alter von 4,2 (0,1-70) Monate, und medianem Gewicht von 4,8 (2,5-18,8) Kg wurden nach korrektiven Operationen mit der EKZ in einer Gruppe mit (n=62) und ohne MUF (n=75) eingeschlossen. Das Protein S-100B wurde vor der MUF, 2 Stunden nach Ende sowie täglich bis zum 3 postoperativen Tag bestimmt (Byk-Sangtec® Dietzenbach-Deutschland).

5.5.2. Ergebnisse

Wie bei allen Untersuchungen stieg die Serumkonzentration des S-100B 2 Stunden nach Ende der EKZ signifikant in beiden Gruppen mit und ohne MUF an (Abbildung 5.5.1). Die Konzentrationen des Proteins S-100B 24 Stunden nach Ende der EKZ bzw. nach Ende der MUF waren jedoch bei den Kindern mit MUF signifikant niedriger ($p < 0.001$) (Abbildung 5.5.1).



Das ultrafiltrierte Volumen ml/kg KG korrelierte mit der postoperativen Serumkonzentration des S-100B 2 Stunden ($r = -0.32$, $p = 0.006$), 24 Stunden ($r = -0.46$, $p = 0.001$) und 48 Stunden nach der MUF ($r = -0.44$, $p = 0.01$).

Beide Gruppen mit und ohne MUF unterschieden sich nicht signifikant hinsichtlich Alter, Gewicht und Bypasszeit und der Medikation mit Suprarenin oder Natrium Nitroprussid.

6. Neurophysiologische und neuropathologische Untersuchungen während der extrakorporalen Zirkulation mit tief hypothermem Kreislaufstillstand an einem Kleintiermodell

Zusätzlich zu den klinischen Studien zur Evaluierung zerebraler Affektionen und Veränderungen der zerebralen Oxygenation und Perfusion, schien es uns notwendig die Pathomechanismen der Hirnschädigung unter Einsatz der klinisch eingesetzten Methoden im tierexperimentellen Modell weiter zu untersuchen.

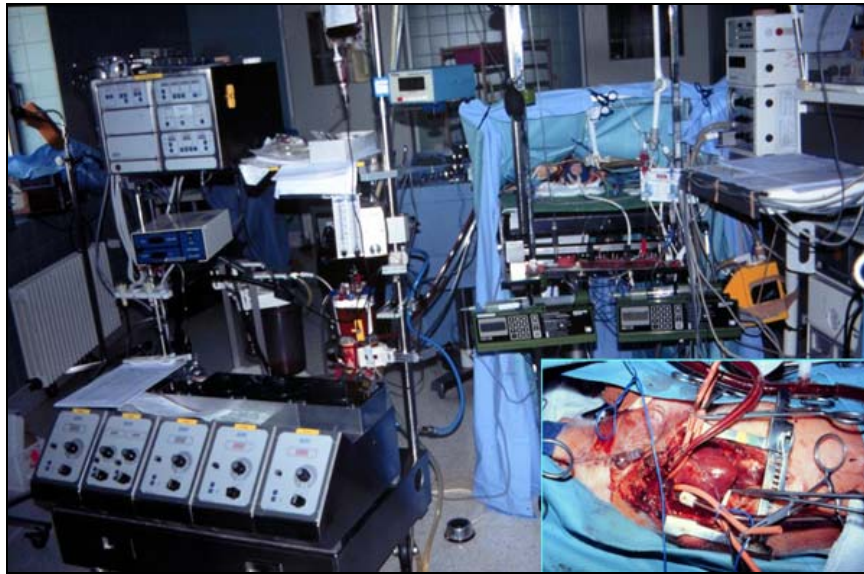


Abbildung 5.5.1: : Versuchsaufbau in der tierexperimentellen Einrichtung der Charité

In diesem Modell wurden dann die gleichen aufwendigen Bedingungen einer extrakorporalen nicht pulsatilen Zirkulation, unter Einsatz des gleichen Typs der neonatalen Oxygenatoren und Kanülen, in der tier-experimentellen Einrichtung simuliert (Abbildung 5.5.1).

Die umfassenden morphologischen, neurophysiologischen und hämodynamischen Erkenntnisse sollten dann bei der Erprobung und Implementierung neuroprotektiver Strategien herangezogen werden.

6.1. Extrakorporale Zirkulation mit tief hypothermem Kreislaufstillstand an einem Kaninchenmodell

Das Modell einer extrakorporalen Zirkulation mit tief hypothermem Kreislaufstillstand wurde zuerst am Kaninchen der Rasse Weiße Neuseeländer im Alter von ca. drei Monaten entwickelt und weiter am neonatalen Schwein fortgesetzt. Die Kanülierung des kleinen Herzens und Führung der EKZ an einem Kleintier mit geringem Blutvolumen wurde erfolgreich erprobt. Mit Hilfe dieses Modells konnten neurophysiologische Veränderungen wie die zerebrale Oxygenation und der Modus der initialen Zellschädigung im Zentralnervensystem evaluiert werden. Aufgrund anatomischer und physiologischer Vorteile beim neugeborenen Schwein gegenüber dem Kaninchen wurde das Modell dann mit neugeborenen Schwein fortgesetzt²⁰⁶.

6.1.1. Vorbereitung und Narkoseführung

Neugeborene Hausschweine im Alter von weniger als 10 Tagen und einem Gewicht zwischen 1,5-2,8 kg werden aus einem Ferkelzuchtbetrieb im Lande Brandenburg am Versuchstag in die tierexperimentelle Einrichtung eingeliefert und bis zum Aufbau des Versuchs unter einer Wärmelampe gehalten. Die Tiere werden dann mit einer intramuskulären Injektion von Ketanest (25 mg/kgKG) und Dormicum (1 mg/kgKG) zur Einleitung einer Narkose prämediziert. Nach Punktion einer Ohrvene wird die Narkose intravenös mit Fentanyl (50 µg/kgKG) und Midazolam (Dormicum, 0.2 mg/kgKG) bei Relaxierung durch Pancuronium (0.2 mg/kgKG) mit bedarfsadaptierter Supplementierung zur Sicherung einer guten chirurgischen Toleranz vertieft und fortgeführt. Die kontrollierte Beatmung erfolgt nach endotrachealer Intubation mit einem Sauerstoff-Luft-Gemisch (Baby-Log Ventilator, Dräger, Lübeck).

Die Ferkel werden unmittelbar nach der Intubation auf die Seite gelagert, und nach Desinfektion des gesamten Rückens wird eine Lumbalpunktion zur Gewinnung von ca. 0.5-0.8 ml Liquor durchgeführt. Zentrale arterielle und venöse Zugänge werden in die Arteria femoralis und in die Vena subclavia gelegt. Nach Freilegung der Vena jugularis interna wird ein feiner Katheter zur kontinuierlichen Registrierung des venösen Drucks und Entnahme von Blutproben zur Bestimmung des O₂-Gehaltes, Glucosekonzentration sowie der verschiedenen Hirnmarker direkt aus dem zerebral venösen Rückstrom vorsichtig bis in den Bulbus jugularis hochgeschoben. Zur Überwachung der Ausscheidung und Urinmenge wird ein suprapubischer Blasen-Katheter gelegt und mit einem Flowmeter verbunden. Die Kerntemperatur wird mit einer rektalen und einer

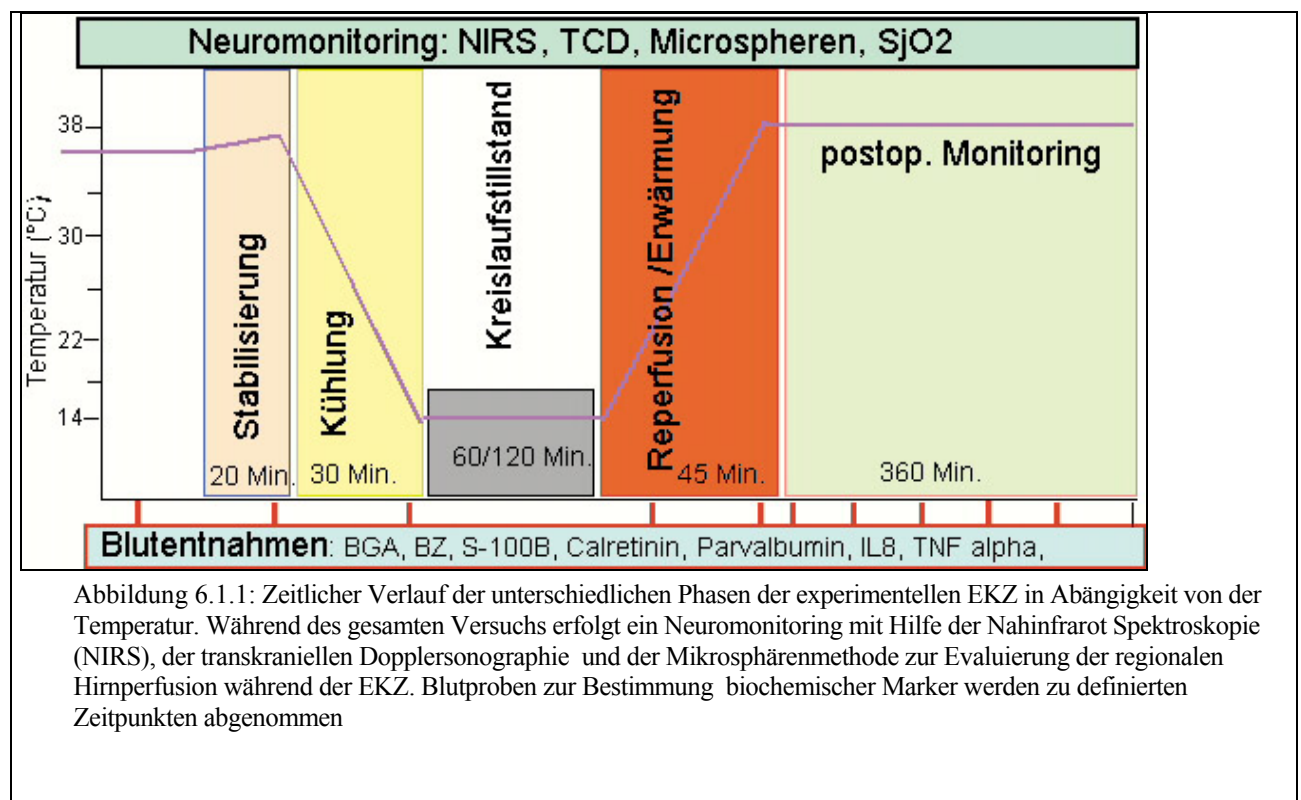
ösophagealen Sonde kontinuierlich überwacht. Die pulsoxymetrische Sättigung wird mit einem Lichtsensor am Schwanz ebenfalls kontinuierlich registriert²⁰⁶.

Zur Regulierung der rektalen Temperatur wird eine Wärmelampe oberhalb des Tieres und eine Wärmematte auf dem OP-Tisch unterhalb des Tieres nach Bedarf während des Experiments ein- oder ausgeschaltet.

6.1.2. Extrakorporale Zirkulation

Die extrakorporale Zirkulation (EKZ) wird gewährleistet durch eine Rollerpumpe (Stöckert-München) und ein neonatales Oxygenatorensystem (SaveMicro, Polystan, Vaerlose, Dänemark). Die Primeflüssigkeit besteht aus frischem Schweinespenderblut (400-500 ml) mit einem Hämoglobinwert von mehr als 7 mg/dl²⁰⁶.

Nach Thorakotomie und Eröffnung des Perikards werden die Aorta ascendens und das rechte Herzohr mit Doppel-U-Nähten (6.0 Prolene) versehen. Dann wird die Aorta mit einer neonaten Aortenkanüle (8 Fr) und der rechte Vorhof mit einer venösen Kanüle (14 Fr) an die EKZ angeschlossen. Nach Start der EKZ wird das Tier über einen Zeitraum von 20 Minuten mit vollem Fluss (200-250 ml/kg/mi) normotherm perfundiert (rektale Temperatur 38 °C) (Abbildung 6.1.1).



Nach dieser Stabilisierungsphase von 20 Minuten wird das Tier mit Hilfe der EKZ systemisch innerhalb von 30 Minuten durch Kühlung des venösen Rückflusses auf eine rektale Temperatur von

13-14°C abgekühlt (Flussrate 200-250 ml/kg/min) (Abbildung 6.1.1). Im Anschluss daran wird ein totaler Kreislaufstillstand in tiefer Hypothermie für 60 bzw. 120 Minuten durch Abstellen der EKZ induziert. Nach langsamer Reperfusion mit kaltem Blut für 10 Minuten und folgender systemischer Erwärmung auf die normale rektale Temperatur von 38 °C über eine Dauer von 45 Minuten wird das Tier von der EKZ entwöhnt und postoperativ für weitere 6 Stunden intensiv-medizinisch überwacht (Abb. 6.2). Die rektale Temperatur wird durch Wärmelampe oberhalb und Wärmematte unterhalb des Tieres nach Bedarf reguliert und auf 37-38 °C gehalten. Der mittlere Perfusionsdruck wird über 60 mmHg gehalten. Die Beatmungsparameter werden nach Blutgasanalyse entsprechend des arteriellen pCO₂ und des Säure-Basen-Haushaltes korrigiert²⁰⁶.

Während des gesamten Versuchs erfolgt ein Neuromonitoring mit Hilfe der Nahinfrarot Spektroskopie (NIRS), der transkraniellen Dopplersonographie und der Mikrosphärenmethode zur Evaluierung der regionalen Hirnperfusion während der EKZ. Blutproben zur Bestimmung biochemischer Marker werden zu definierten Zeitpunkten abgenommen (Abbildung 6.1.1).

6.1.3. Neuromonitoring

Während des Experiments werden die bereits klinisch angewandten Neuromonitoring-Methoden wie transkranielle Dopplersonographie und Nahinfrarot-Spektroskopie eingesetzt. Zur Ermittlung der regionalen Hirnperfusion werden zusätzlich fünf unterschiedlich fluoreszierende Mikrosphären verwendet.

6.1.3.1. Transkranielle Dopplersonographie

Während des gesamten Versuchs wird die zerebrale Flussgeschwindigkeit in der Arteria cerebri media (ACM) mit transkranielle Dopplersonographie mit einer gepulsten 2 MHz Ultraschallsonde kontinuierlich registriert (DWL, Sipplingen, Deutschland)¹³¹. Die Sonde wird in der Temporalregion des Kopfes platziert, das Sample Volume auf 15 mm eingestellt und die Tiefe standardisiert bei 32 mm gehalten. Dies erlaubt eine on-line-Aufnahme der mittleren Flussgeschwindigkeit (V_m) und des pulsilen Index (PI) vor, während und nach EKZ. PI errechnet sich als:

$$PI = \frac{(\text{Geschwindigkeit des Maximalflusses} - \text{Geschwindigkeit des enddiastolischen Flusses})}{\text{Geschwindigkeit des durchschnittlichen Flusses}}$$

Ein Flussfilter wird verwendet, um die langsamen diastolischen Flussgeschwindigkeiten registrieren zu können. Die Durchschnittswerte von V_m und PI werden alle fünf Minuten in acht Herzzyklen erhoben, um eine repräsentative Tendenz der ursprünglich erhobenen V_m und PI zu ermitteln.

Während der EKZ wurde nur die mittlere Flussgeschwindigkeit zur qualitativen Beurteilung der zerebralen Perfusion herangezogen. Der PI zur Beurteilung der zerebralen Pulsatilität (PI) ist nur bei ausreichender Pulsatilität ohne EKZ-Fluss von Bedeutung.

6.1.4. Nahinfrarot-Spektroskopie (NIRS)

Die regionale intravaskuläre und intrazelluläre Oxygenation wird mit Hilfe der Nahinfrarot-Spektroskopie kontinuierlich überwacht und auf einem Rechner gespeichert (Criticon 2020, Johnson-Johnson, England)^{138,207}.

Zur statistischen Auswertung der regionalen zerebralen Hämoglobinsättigung, der simultan erhobenen hämodynamischen Parameter „mittlerer arterieller Druck“ und Hämoglobinkonzentration sowie der rektalen Temperatur wurden charakteristische OP-Phasen während der extrakorporalen Zirkulation ausgewählt und durch repräsentative Werte dargestellt. Für jede der charakteristischen OP-Phasen wurde der Mittelwert einer fünfminütigen kontinuierlichen Registrierung zur weiteren statistischen Auswertung ermittelt¹³⁸.

6.1.5. Evaluierung der regionalen Hirnperfusion mittels Mikrosphären

Die Mikrosphärentechnik kann verwendet werden zur Bestimmung des regionalen Blutflusses, zur Messung von Flussunterschieden im Körper und zur Messung der Auswurfleistung des Herzens. In unserem Falle diente sie der Messung des regionalen Blutflusses im Gehirn. Die Mikrosphären sind kleine runde Partikel (Durchmesser $15 \mu\text{m} \pm 0,1 \mu\text{m}$ SD) aus Polystyren. Sie besitzen eine Dichte von 1,05 g/ml und entsprechen in dieser Eigenschaft in etwa den Blutzellen (1,10 g/ml). Die Mikrosphären werden in 0,15 molarer NaCl-Lösung mit 0,02-0,05% Tween 20 und 0,02% Thimerosal aufbewahrt. Zur Injektion wird circa 1 ml dieser Suspension auf einige ml NaCl-Lösung aufgezo- gen. Nach intravasaler Gabe werden die Mikrosphären mit dem Blutstrom bis in das Kapillarbett getragen und bleiben dort aufgrund ihrer Größe stecken. Diese Art der Mikroembolisation wird bei den im Versuch verabreichten Mengen strömungstechnisch nicht relevant, macht es jedoch möglich, nach Entnahme des Organs die Mikrosphärenanzahl pro Volumeneinheit Gewebe zu ermitteln. Diese spiegelt die regionale Durchblutung zum Applikationszeitpunkt wieder. Es gibt verschiedene Arten von Mikrosphären, nämlich radioaktiv markierte, gefärbte und fluoreszierende.

Fünf unterschiedlich fluoreszierende Mikrosphären (FluoSpheres, Molecular Probes Inc., Leiden, Holland) wurden im vorliegenden Falle zur quantitativen Evaluierung der globalen und regionalen Hirnperfusion in den Hauptphasen der EKZ eingesetzt. Die Injektion von 1 ml Mikrosphärensuspension enthält $1,0 \times 10^6$ fluoreszierende Mikrosphären. Die Mikrosphärensuspension wird über fünf Minuten in einem Ultraschallbad vernebelt und danach in die aortale Kanüle über 30 Sekunden injiziert. Gleichzeitig wird eine Blutprobe zur Bestimmung der Referenzwerte der Mikrosphären im arteriellen Blut mit Hilfe einer Absaugpumpe in einem konstanten Fluss von 12 ml/min über zwei Minuten entnommen. Hämodynamische Parameter wie Perfusionsdruck, Flussraten der EKZ und Temperatur werden simultan registriert. Nach Ende des Akutversuchs werden Proben aus den unterschiedlichen Hirnarealen entnommen, zugeschnitten und für die Extraktion und Messung der regionalen Konzentration der unterschiedlichen Mikrosphären für die unterschiedlichen Phasen der EKZ durch Tiefgefrieren bei -75°C konserviert.

Zum Aufarbeiten wird jede Hirnprobe in ein mit Natronlauge (NaOH) gefülltes Reagenzglas gegeben und über Nacht unter einem Abzug bei 45°C inkubiert. Dies führt durch Auflösung des Gewebes zur Bildung einer filtrierbaren Suspension. Nach beendeter Mazeration werden die verdauten Proben mit Hilfe einer Millipore-Vakuum-Pumpe unter Verwendung von Filterpapieren mit einer Porengröße von 10 μm von den Mikrosphären getrennt. Die Sphären tragenden Filterpapiere werden vorsichtig zweimal in der Mitte gefaltet, so dass die Mikrosphären innen liegen, und in ein kubisch zulaufendes Reagenzglas gegeben. In einem Trockenschrank trocknen sie daraufhin 15 Minuten lang bei 50°C . Dann wird auf jedes Filterpapier gleichmäßig eine genau definierte Menge Lösungsmittel (100 μl 2-Ethoxyäthyl-Acetat oder Xylen) gegeben und das Reagenzglas für 30 Sekunden auf einem Vortexgerät geschüttelt. Danach wird der gesamte Inhalt fünf Minuten lang bei 2000 g zentrifugiert und der Überstand wiederum in ein Reagenzglas abpipettiert. Um sicherzugehen, dass die Lösung aus Dye (Farbstoff) und Lösungsmittel gänzlich von Partikeln befreit wird, zentrifugiert man noch einmal drei Minuten lang bei einer Beschleunigung von 2000 g. Der Überstand wird in eine 100 μl -Quarzküvette pipettiert. Dieses Vorgehen führt zu einem kompletten Lösen des Farbstoffs aus den Mikrosphären. Das überstehende Lösungsmittel mit dem gelösten Farbstoff wird abpipettiert und das Extinktionsspektrum der Flüssigkeit im Spektrometer gemessen.

Zur Messung der Extinktionsspektren kann nahezu jedes Fluoreszenzspektrometer verwendet werden, das im Wellenlängenbereich von 350 – 750 nm misst. Wir verwendeten das Luminiszenz-Spektrometer LS 50 B (Perkin Elmer). Bei Messung der Proben erhält man ein aus den verschiedenen einzelnen Spektren der in der Gehirnprobe enthaltenen Mikrosphären ein

zusammengesetztes Spektrum (Composit-Spektrum). In dem von uns genutzten Gerät haben wir ein Softwareprogramm installiert, das ein Composit-Spektrum in die einzelnen Spektren auseinanderdividieren kann. Weiterhin kann die Absaugrate der Blutproben (7,8 ml/min) eingegeben werden. Aus der Absaug-Rate (R), dem Spektrum der Blutprobe (S ref) und dem Composit-Spektrum (S i) kann so der Blutfluss zu der betreffenden Hirnprobe (F i) errechnet werden:

$F_i = (S_i) (R) / (S_{ref})$ [ml/min]. Durch Eingabe des Gewichts der Gewebeproben wird der regionale Blutfluss (RBF [ml/min*g]) berechnet.

6.1.6. Biochemische Marker für die zerebrale Ischämie

Blutproben werden aus dem zerebralvenösen Rückstrom zu definierten Zeitpunkten durch die sondierte Vena jugularis interna aus dem Bulbus jugularis entnommen (Abb. 6.2). Die Blutproben werden zentrifugiert und sofort bei $-75\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. Das Astrogliazellprotein S-100B und die neurale spezifische Enolase (NSE) werden im Serum und Liquor mit Hilfe eines LIA Kits bestimmt (Byk-Sangtec, Dietzenbach, Deutschland). Die neuronalen Marker Parvalbumin und Calretinin, die spezifisch in Subpopulationen einiger Neurone im Gehirn vorkommen, werden durch neuentwickelte Antikörper in Zusammenarbeit mit Prof. Marco Celio von der Universität Fribourg in der Schweiz bestimmt. Der Sauerstoffradikalmetabolismus wird anhand der Bestimmung der Konzentrationen von Malondialdehyd im Serum und Liquor bestimmt (siehe 5.3). Verfügbare immunologische Parameter für Schweine sind Interleukin 8 (IL-8) und der Tumor-Nekrosefaktor-Alpha (TNF- α). Diese Cytokine werden mit Hilfe eines Elisa Kits (CytoScreen, Biosource, Solingen, Deutschland) in dem immunologischen Labor des Instituts für klinische Immunologie der Charité bestimmt.

7. Morphologie des Gehirns nach extrakorporaler Zirkulation und tief hypothermem Kreislaufstillstand

7.1. Histologie

Der Schädel wird eröffnet, das Gehirn sorgsam entfernt und sofort auf Eis gelegt. Die Hälfte des Gehirns wird in standardisierten repräsentativen koronaren Scheibchen geschnitten, mit Gelmedium umgeben und sofort auf Trockeneis für spätere molekulargenetische Untersuchungen bei -80 °C aufbewahrt. Die andere Hälfte wird nach Kühlung des Gehirns auf Eis für ca. 10 Minuten in einem Lösungsgemisch aus Paraformaldehyde, Glutaraldehyde 25% und Pikrinsäure mit einem neutralen pH (7,4) (SOMOGYI-Lösung) ²⁰⁸ bei einer Temperatur von 4 °C bis zur Einbettung und immunhistochemischen Färbung sowie elektronenmikroskopischen Bearbeitung für 48 Stunden fixiert. Die Gewebeproben für Lichtmikroskopie werden in Paraffin eingebettet, von denen später 6 µm dünne Schnitte gefertigt und mit Haematoxylin und Eosin gefärbt werden.

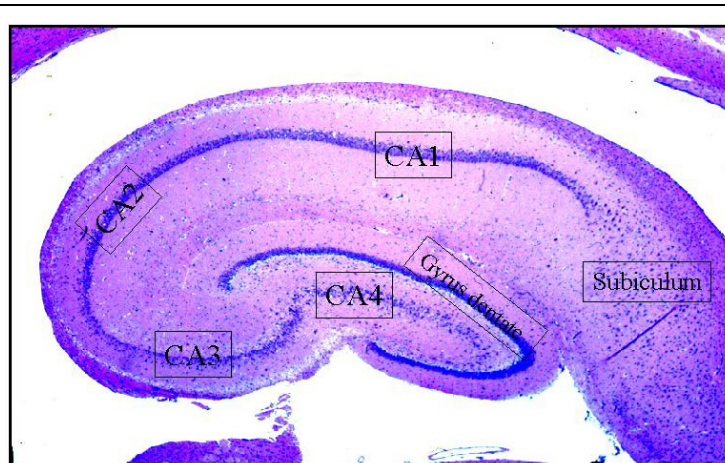


Abbildung 7.1.1:

Für die Quantifizierung der hypoxischen und apoptotischen Neuronen wurden in 40facher Vergrößerung die einzelnen Sektoren des Ammonshorns (CA1-CA4) sowie des Gyrus Dentatus und Subiculum in einem Gitterfeld von 100 Quadraten beurteilt (Abbildung 7.1.1).

In 10 Quadraten wurden mindestens 500-600 Neurone gezählt. Der Anteil der hypoxischen Neurone aus der Gesamtzahl der gezählten normalen Neuronen wurde in Prozent angegeben. Die Klassifizierung der hypoxischen Schädigung in jedem Sektor wurde nach einer Skala von 0-4 wie folgend beurteilt: 0; keine hypoxischen Neurone, 1; hypoxische Neurone <25%, 2; hypoxische Neurone 25-50%, 3; hypoxische Neurone 50-75%, 4; hypoxische Neurone >75%.

7.1.1. Protein S-100B

Das Protein S-100B ist überwiegend in den Astrogliazellen und Schwannzellen lokalisiert ¹⁵⁶. Die Astrozytenreaktivität wird immunhistochemisch mit monoklonalen Maus-Antikörpern gegen das Protein S-100B in fixierten und in Paraffin eingebetteten Schnitten nachgewiesen (DPC® Immustain, code CKS1S, DPC, Los Angeles, USA). Da das Protein S-100 wasserlöslich ist, findet sich nach dervEKZ eine Anfärbung nicht nur im Zytoplasma der Astrozyten sondern auch im extrazellulären Raum (Abbildung 7.1.2).

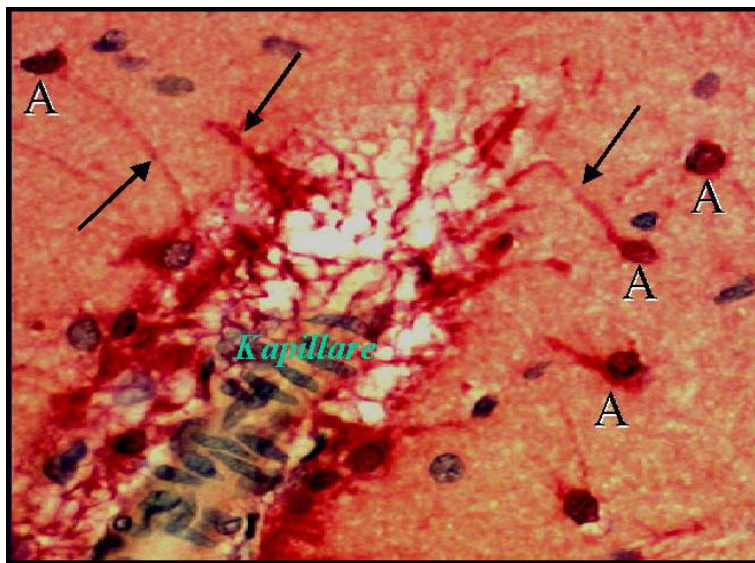


Abbildung 7.1.2:
Immunhistochemische Färbung der Astrozyten (A) im Hippocampus. Das Protein S-100B ist rot in den Astrozyten und ihren Fortsätzen gefärbt (Pfeil). Die topographische Beziehung zwischen den Astrozyten und den Kapillaren könnte den Mechanismus der Freisetzung des S-100B aus den Astrozyten in die Blutbahn zum Teil erklären.

7.1.2. Neuronenspezifische Enolase (NSE)

Monoklonale Maus-anti-human-NSE-Antikörper wurden in Paraffinschnitten eingesetzt, um die Lokalisation der NSE in den Neuronen zu identifizieren (DAKO-NSE, H14, Code No.M 873 Lot No.120). Die Enolasen sind Homo- oder Heterodimere, bestehend aus 3 Subeinheiten. Die Gamma-Subeinheit ist nur in den Neuronen vorhanden. Gamma-Gamma kann auch in anderen Zellen, wie Thrombozyten oder Megakaryozyten, T-Zellen und glatter Muskulatur vorkommen ^{209,210}. Verlust oder Verblassen der Immunfärbung wurde als neuronale Schädigung interpretiert.

7.1.3. Parvalbumin

Das neuronale Ca^{++} -bindende Protein Parvalbumin wurde mit Hilfe monoklonaler Maus-Antikörper in Schnitten von fixiertem und in Paraffin eingebetteten Hirngewebe nachgewiesen (S. Want, Swiss antibodies, Bellinzona, Switzerland). Der monoklonale Antikörper Mouse IgG1 wird durch Hybridisierung von Myelomzellen mit Milzzellen aus Mäusen, die vorher mit Parvalbumin aus Karpfenmuskeln immunisiert wurden, gewonnen ²¹¹. Antikörper gegen das Parvalbumin reagieren spezifisch gegen die Ca-Bindungsstelle an dem Protein ²¹¹. Die Bindungsstelle kann dann indirekt durch Immunoperoxidase-Färbung sichtbar gemacht werden.

Ähnlich wie bei NSE wurde ein Verlust oder Verblässen der Immunfärbung in den angefertigten Schnitten als Zellschädigung interpretiert.

7.2. Elektronenmikroskopie

Für die Elektronenmikroskopie werden standardisierte Regionen im Hippocampus, Gyrus cinguli, Stammganglien und Kleinhirn zugeschnitten, dehydriert und dann in Araldite eingebettet. Anschließend werden Semi-Dünnschnitte angefertigt und mit Toluidinblau angefärbt. Ultradünnschnitte werden aus ausgewählten Regionen angefertigt, im EM 10 mikroskopiert und dokumentiert.

7.3. *Modus der neuronalen Zellschädigung nach extrakorporaler Zirkulation und tief hypothermem Kreislaufstillstand*

Die neuronale Zellschädigung nach der extrakorporalen Zirkulation mit ausreichendem Fluss und normalem Perfusionsdruck ist als minimal anzusehen und nach einer Überlebensdauer von sechs Stunden nicht sicher zu beurteilen. Signifikante neuronale Schädigungen treten dann auf, wenn die zerebrale Perfusion fokal oder global während der EKZ gestört ist. Daher war es notwendig, das Zentralnervensystem während standardisierter Perioden von extremen Situationen wie Kreislaufstillstand in tiefer Hypothermie zu untersuchen. Dieser Kreislaufstillstand wird weiterhin bei der operativen Korrektur komplexer Vitien wie hypoplastischem Linksherzsyndrom und totaler Lungenvenenfehleinmündung eingesetzt.

7.3.1. Nekrose

Die Ischämie ist definiert als ein Abfall der zerebralen Perfusion unter einem kritischen Punkt, an dem der Energiebedarf zur Erhaltung einer funktionellen und strukturellen Integrität der Hirnzellen nicht gewährleistet werden kann. Die Manifestation der hypoxisch-ischämischen Schädigung in den neuronalen und astroglialen Zellen kann sofort oder verzögert, nach Stunden oder Tagen, auftreten^{212,213}. Die Mechanismen der Hirnzellschädigung und der Neuronenverlust nach einem hypoxisch-ischämischen Ereignis sind multifaktoriell. Einstürme von Ca^{++} -Ionen in die Zelle oder erhöhte intrazelluläre Freisetzung von Ca^{++} -Ionen wird als eine auslösende Ursache des frühen und verzögerten Zelltodes angesehen^{212,214-216}. Die vermehrten Ca^{++} -Ionen in den Zellen oder Zellorganellen führen zu einer enzymatischen Aktivierung von Lipasen, Proteasen und Endonucleasen, durch die es wiederum zum Abbau von Membranlipiden, des Zytoskeletts und zur Zerstörung der DNA kommt²¹⁴. Zusätzlich führt die ischämie-bedingte Hyperkalzämie zur Suppression der Proteinsynthese und damit insgesamt zu einer Beschleunigung des Zelltodes²¹⁴.

Die hypoxisch nekrotisch veränderten Neurone werden in Hämatoxylin und Eosin (HE) Färbung ausgewertet. Die hypoxischen Neurone werden quantitativ morphometrisch in der Region des Hippocampus, Großhirns und der Stammganglien erfasst. Es werden pro Region 500 Neurone hinsichtlich nekrotischer Veränderungen gezählt und beurteilt.

Der hypoxisch bedingte nekrotische Zelltod ist lichtmikroskopisch charakterisiert durch Eosinophilie des Zytoplasmas, Zellschrumpfung und Kernveränderungen in Form von Kernpyknose und Kernbasophilie²¹⁷ (Abb. 7.3.1). Ultrastrukturell wurde eine Schwellung und Dilatation der Mitochondrien und anderen Zellorganellen sowie eine Zellmembranruptur beobachtet.

7.3.2. Apoptose

Der Begriff Apoptose "griechisch, Herabfallen" wurde erstmal von Kerr und seinen Mitarbeitern als Bezeichnung für eine aktive Form des Zellunterganges neben der Nekrose geprägt²¹⁸. Im Gegensatz zum passiven nekrotischen Zelluntergang ist die Apoptose ein aktiver energieabhängiger Prozess der Zellzerstörung, welcher unter anderem auch physiologisch im gesunden Gewebe vorkommt²¹⁹⁻²²¹. Morphologisch ist Apoptose im Gegensatz zur Nekrose durch Genomfragmentation, Zellschrumpfung und initialen Erhalt der Zellorganellen und der Zellmembran charakterisiert^{219,220,222}. Der apoptotische Zelltod bzw. der verzögert-genetisch programmierte Zelltod wird durch die mitochondriale Dysfunktion und Freisetzung des Apoptose-induzierten Faktors Cytochrom c aus den geschwollenen Mitochondrien getriggert^{214,215,223-225}.

Wenn die Mitochondrien nach einer Ischämie-Reperfusions-Phase einer Akkumulation von Ca^{++} -Ionen oder oxidativem Stress durch Sauerstoffradikale ausgesetzt sind, öffnen sich in der mitochondrialen Membran die sogenannten Ca^{++} -Poren (*mitochondrial permeability transition pore MPT*), die zum Kollaps des Membranpotentials, zum Abbruch der ATP-Synthese und zur Freisetzung von Cytochrom c führen^{168,214,226,227}. Cytochrom c aktiviert eine Reihe von Enzymen des Transkriptionsfaktors, die zur Zerstückelung und Auflösung der DNA führen^{228 225,229,230}.

Es wird vermutet, dass die mitochondriale Membranfunktion zum Teil durch die antiapoptotischen Gene der Bcl-2 Familie kontrolliert wird²²⁸. Hemmung der Expression dieser antiapoptotischen Gene wie Bcl-2 und Bcl-X_L zugunsten der pro-apoptotischen Gene Bax und FAS führt demnach zur Induktion der Apoptose in den Hirnzellen²³¹.

Die morphologischen Aspekte des apoptotischen Zelltodes umfassen lichtmikroskopisch die Kriterien der Zellschrumpfung unter Erhalt der Zellmembran mit charakteristischen Kernveränderungen in Form von Heterochromatisation (DNA-Fragmentation)^{219,220 232}. Der fragmentierte Kerninhalt erscheint als Chromatin-Körperchen oder apoptotic bodies²²². Bei der Apoptose liegen neben der Zellschrumpfung auch Oberflächenveränderungen vor, wobei Materialien, die aus der Zelle stammen, an der Oberfläche präsentiert werden.

Der apoptotische neuronale Zelltod wird nach der TUNEL-Methode (terminal transferase-mediated dUTP-digoxigenin nick end-labeling) (Boehringer, Mannheim, Germany) gefärbt. Die morphologischen Aspekte der Apoptose werden in Semi-Dünnschnitten weiter beurteilt und bestätigt.

7.4. Ergebnisse

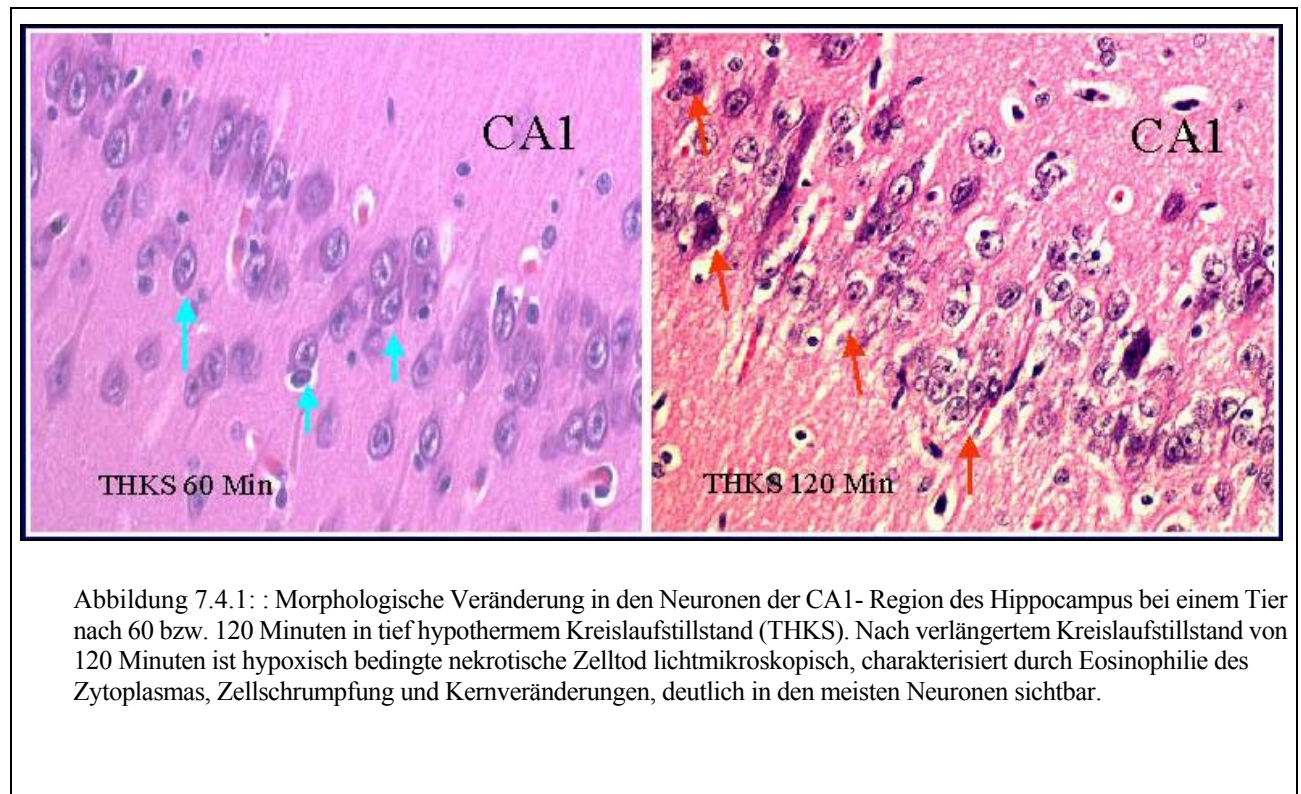
7.4.1. Schädigungsmuster im Zentralnervensystem nach EKZ und tief hypothermem Kreislaufstillstand

7.4.1.1. Morphologische Aspekte nach EKZ

Bei den untersuchten Tieren ohne hämodynamische oder respiratorische Komplikationen wurde, außer einer mässig diffusen Schwellung in den astrozytären Zellanteilen im perivaskulären Regionen, keine signifikante neuronale Zellschädigung in den untersuchten Hirnregionen festgestellt.

7.4.1.2. Morphologische Aspekte nach tief hypothermem Kreislaufstillstand

Nach der Induktion einer Stillstandsphase der gesamten Zirkulation von 60 Minuten in tiefer Hypothermie war eine signifikante neuronale Zellschädigung zu erwarten. Die quantitative Bewertung der neuropathologischen Aspekte in den untersuchten Regionen besonders im Hippocampus zeigte erstaunlicherweise keinen Hinweis auf signifikante hypoxische Schädigung der Neuronen nach unkomplizierten Experimenten mit einem tief hypothermen Kreislaufstillstand von 60 Minuten ⁴³. Der Anteil der hypoxisch-nekrotischen Neuronen betrug ca. 5%. Die neuropathologischen Veränderungen dominierten jedoch in den Astrogliazellen in Form von Schwellung der Astrozyten und ihrer Fortsätze im perivaskulären Bereich ⁴³. Neuronale Zellnekrose oder Apoptose trat nur vereinzelt auf.



Der Anteil der neuronalen Zellnekrose stieg jedoch nach Verlängerung des Kreislaufstillstandes in CA4 des Hippocampus von 5% auf 80%. Zusätzlich war der Anteil von apoptotischen Neuronen im Gyrus dentatus deutlich sichtbar ²³³. Embolische Infarkte fanden sich weder makroskopisch noch mikroskopisch in den untersuchten Hirnarealen. Eine inflammatorische Reaktion der Mikroglia wurde unabhängig von der Ischämiedauer nicht festgestellt.

7.4.2. Zerebrale Oxygenation

Die Veränderungen von Konzentrationen des oxygenierten (HbO₂) und deoxygenierten Hämoglobin (deoxy.Hb), der regionalen Hämoglobinsättigung (rSO₂) sowie der intrazellulären Cytochromoxydase (Cyt.Ox.aa3) wurden mit einem Zerebraloxyrometer (Criticon, Johnson&Johnson) online registriert. (s. 4.3) In beiden Gruppen wurde ein ähnliches Veränderungsmuster der intravaskulären und intrazellulären Oxygenationsparameter während der EKZ und des tiefhypothermen Kreislaufstillstand (THKS) festgestellt (Abbildung 7.4.2). In allen Tieren wurde ein initialer Anstieg von HbO₂, rSO₂ und ein Abfall von deoxy. Hb während der Kühlungsphase auf 14°C beobachtet (p=0.01). In dieser Phase kam es ebenfalls zu einem geringen Abfall von Cyt.Ox.aa3. (Abbildung 7.4.2) Trotz der größeren Schwankungen der intravaskulären Hämoglobinparameter zeigte das intrazelluläre Cyt.Ox.aa3-Signal einen signifikanten Abfall erst nach Unterbrechung der Zirkulation während der tiefhypothermen Stillstandsphase ¹³⁸.

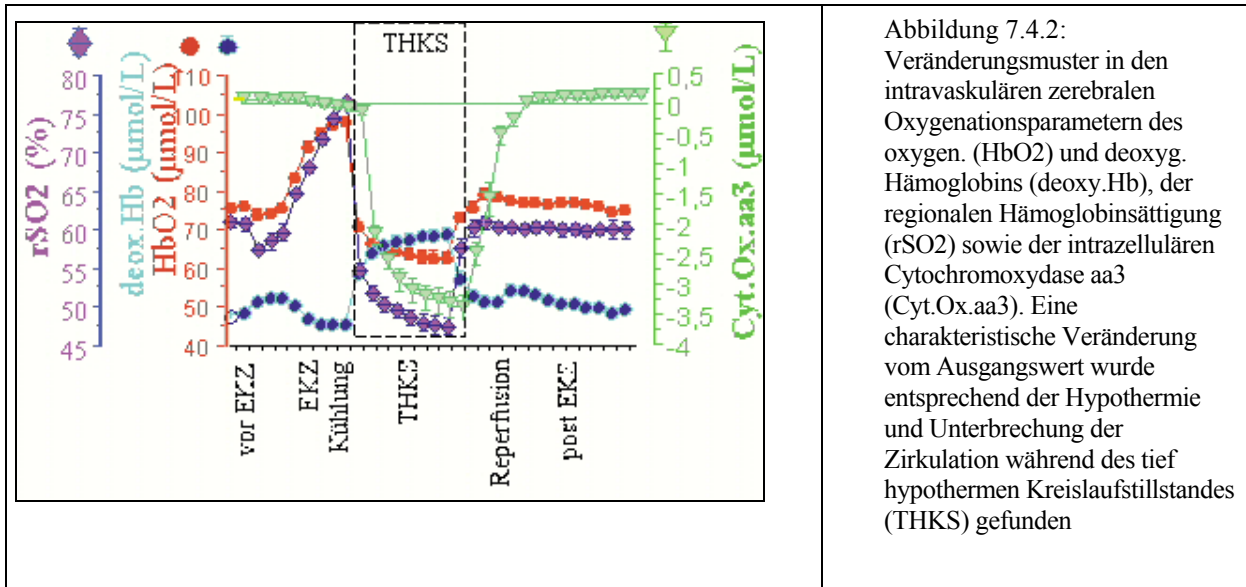


Abbildung 7.4.2:
Veränderungsmuster in den intravaskulären zerebralen Oxygenationsparametern des oxygen. (HbO₂) und deoxyg. Hämoglobins (deoxy.Hb), der regionalen Hämoglobinsättigung (rSO₂) sowie der intrazellulären Cytochromoxydase aa₃ (Cyt.Ox.aa₃). Eine charakteristische Veränderung vom Ausgangswert wurde entsprechend der Hypothermie und Unterbrechung der Zirkulation während des tief hypothermen Kreislaufstillstandes (THKS) gefunden

Nach Beginn des THKS in tiefer Hypothermie kam es zunächst zu einem signifikanten kontinuierlichen Abfall von HbO₂ und Cyt.Ox.aa₃ ($p=0.0001$) sowie einem Anstieg von des deoxy.Hb ($p=0.01$). Der kontinuierliche Abfall der Cyt.Ox.aa₃ korrelierte mit der Dauer des Kreislaufstillstandes während der ersten 45 Minuten. Nach ca. 45 Minuten wurde eine Plateauphase ohne weiteren signifikanten Abfall erreicht. In der anschließenden Phase der Reperfusion und Erwärmung stellte sich größtenteils eine Erholung der Cyt.Ox.aa₃ Werte ein. Der Ausgangszustand der verschiedenen Parameter wurde jedoch in der postoperativen Phase nach Ende der EKZ erreicht (Abb. 7.2.1).

Die regionale Hämoglobinsättigung (rSO₂) repräsentiert die gemischt-venöse Sättigung im zerebral venösen Blut. Wie bei den klinischen Ergebnissen zur Validisierung der transkraniell gemessenen rSO₂ mit NIRS fanden wir auch in diesem experimentellen Teil mit nicht-physiologischen Situationen während der EKZ und tiefhypothermem Kreislaufstillstand einen engen Zusammenhang zwischen der Veränderung in der rSO₂ und der oxymetrisch gemessenen Sättigung des venösen Blutes im Bulbus jugularis (Abb. 7.4.1-4) ^{139,207}.

Mit Hilfe einer Multiregression zeigte sich ein signifikant unabhängiger Einfluss des MAD unter 35 mmHg ($p<0,01$) und der Abnahme der Hämatokritkonzentration unter 22% ($p\leq 0,01$) auf der Reduktion der rSO₂. Eine signifikante Abnahme der rSO₂, definiert als Abfall um 10% des Ausgangswertes für die Dauer von drei Minuten, war ebenfalls mit einer entsprechenden Abnahme der Cyt.Ox aa₃ verbunden (Abbildung 7.4.1).

7.4.3. Zerebrale Perfusion

Die zerebrale Perfusion wurde qualitativ mit Hilfe der transkraniellen Dopplersonographie und quantitativ mit der Mikrosphärentechnik beurteilt.

7.4.3.1. Beurteilung der zerebralen Flussgeschwindigkeiten mit transkranieller Dopplersonographie (TCD)

Die TCD liefert nur Informationen über die Blutgeschwindigkeit in einem Gefäßabschnitt der basalen zerebralen Gefäße. Die erhobenen Daten anhand serieller Messungen der mittleren Flussgeschwindigkeit (V_m) in der Arteria cerebri media zeigten jedoch einen repräsentativen Verlauf entsprechend der Veränderung in der regionalen und globalen zerebralen Perfusion (Abbildung 7.4.1).

Die allmähliche Abnahme der mittleren Flussgeschwindigkeit in der Arteria cerebri media, trotz einer konstanten EKZ-Flussrate und eines Perfusionsdrucks während der systemischen Kühlung, spiegelt möglicherweise eine Reduktion des zerebralen Metabolismus durch die Hypothermie wieder. Die kontinuierliche Registrierung des Flussmusters mit dem TCD während der Kannülierung und der anderen unterschiedlichen Phasen der EKZ konnte jegliche Störung im jeweiligen Flussgebiet der Arteria cerebri media sofort und online anzeigen.

7.4.3.2. Beurteilung der regionalen zerebralen Perfusion mit Mikrosphären

Zur Beurteilung der quantitativen regionalen zerebralen Perfusion wurden unterschiedliche Mikrosphären zu den charakteristischen Phasen der EKZ injiziert. Hier zeigte sich eine signifikante Abnahme der zerebralen Perfusion in allen Hirnregionen nach der systemischen Kühlung. Unmittelbar nach der Reperfusion und Erwärmung zeigte sich ein transienter Anstieg der regionalen Hirnperfusion, der sich nach einer Stunde durch Erreichen der Ausgangswerte vor der EKZ normalisierte (Abbildung 7.4.3.).

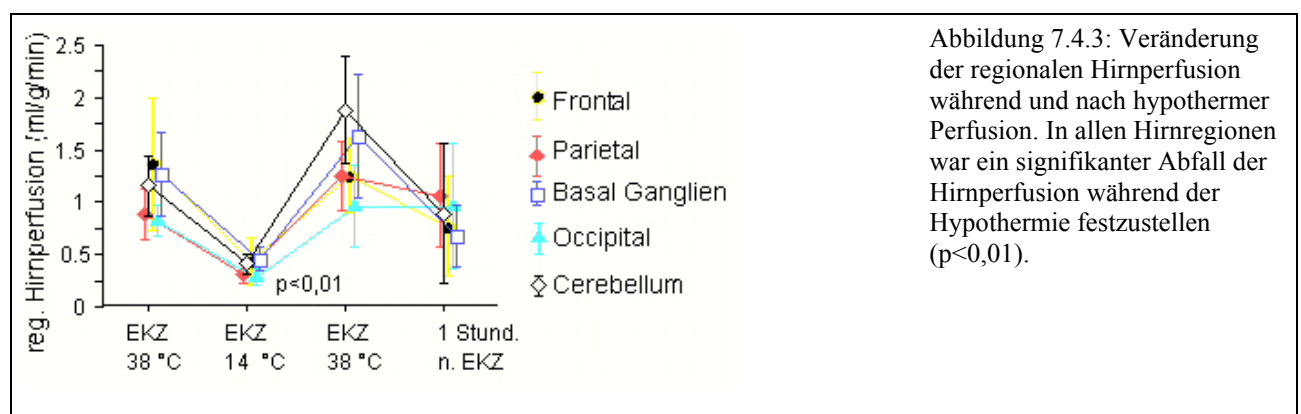


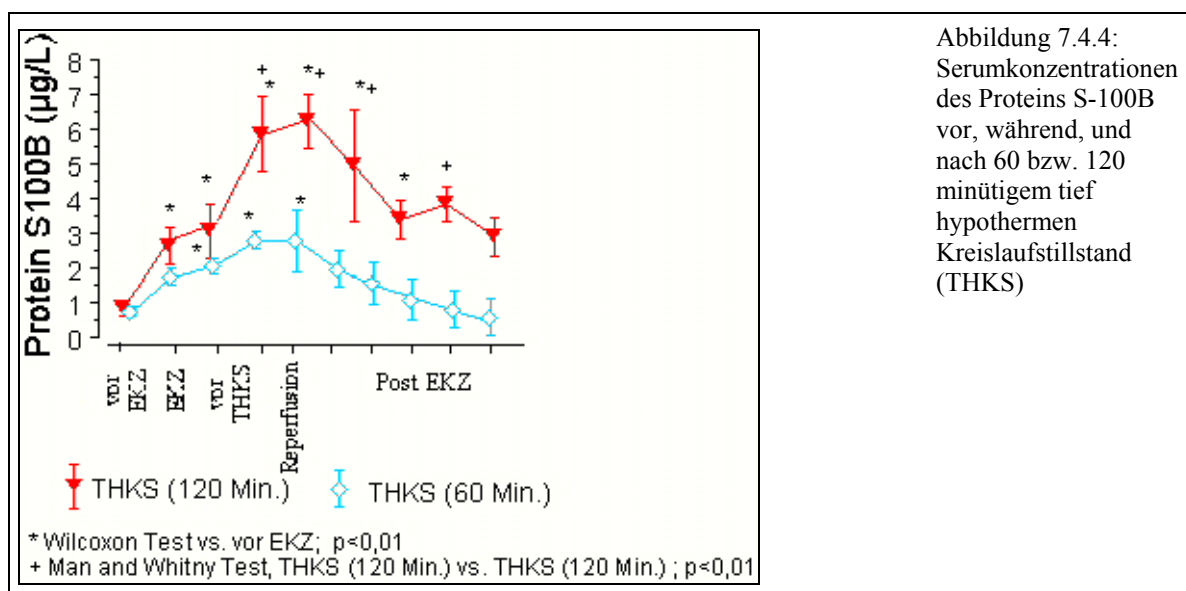
Abbildung 7.4.3: Veränderung der regionalen Hirnperfusion während und nach hypothermer Perfusion. In allen Hirnregionen war ein signifikanter Abfall der Hirnperfusion während der Hypothermie festzustellen ($p < 0,01$).

Die Veränderung in der regionalen zerebralen Perfusion während der EKZ und der systemischen Kühlung war korrespondierend zu der Veränderung im zerebralen Flussmuster in der Arteria cerebri media.

Diese Beobachtung unterstreicht die Bedeutung der nicht-invasiven Überwachung der zerebralen Perfusion mit Hilfe der transkraniellen Dopplersonographie während Korrekturoperationen mit der EKZ..

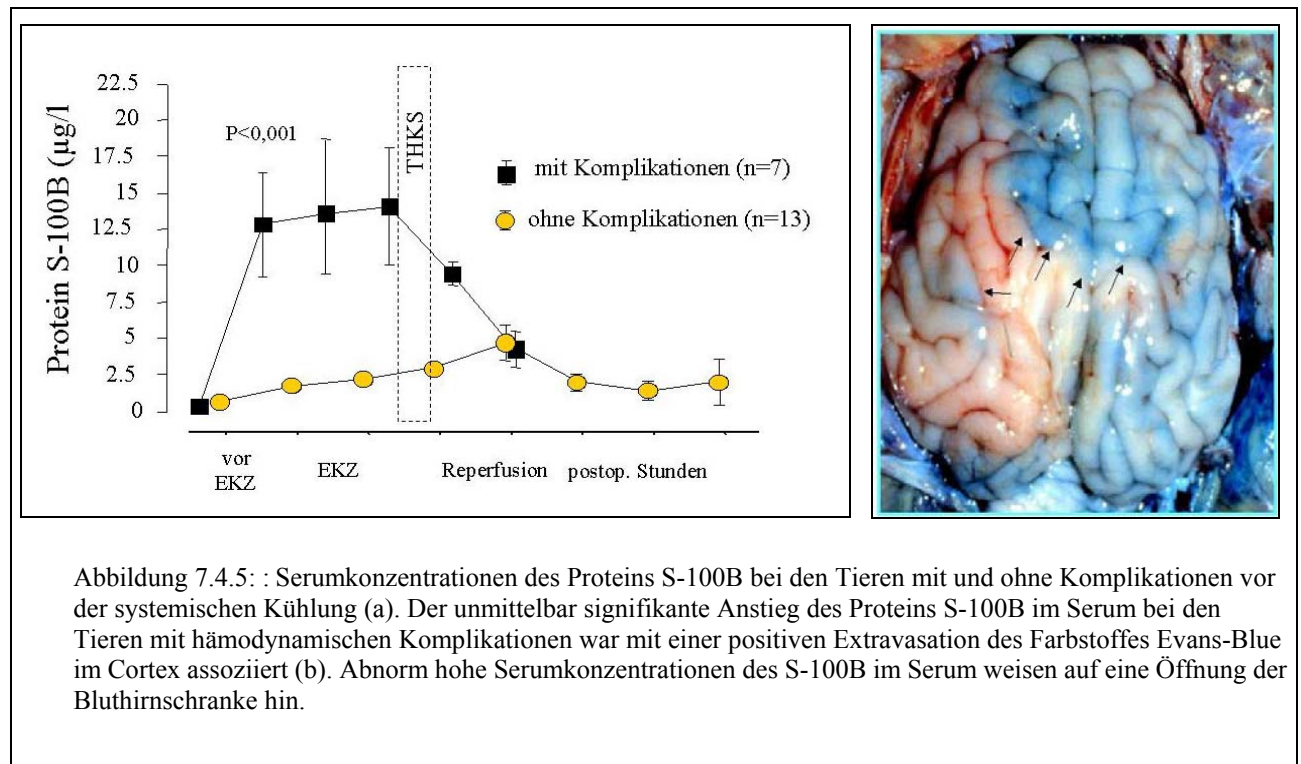
7.4.4. Wertigkeit des zerebralen Markers S-100B im Serum als Marker einer Störung in der Bluthirn-Schranke.

Die Serumkonzentration des S-100B wurde zu neun standardisierten Zeitpunkten während des gesamten Experiments gemessen. Tierexperimentell zeigte sich eine ähnliche Kinetik der Serumwerte wie bei den Neugeborenen während der Herzoperationen mit EKZ (s. Abschnitt 5.3). Unmittelbar nach extrakorporaler Perfusion und systemischer Kühlung stieg die Serumkonzentration schon vor dem Kreislaufstillstand in allen Tieren signifikant an (Abbildung 7.4.4). Der Hauptanstieg der Serumkonzentration fand jedoch während und nach der Reperfusion statt. Die Serumkonzentrationen waren nach Ende der Kühlung am Bypass und nach dem Kreislaufstillstand in tiefer Hypothermie in der Gruppe von Tieren mit 120minütigem tiefhypothermen Kreislaufstillstand signifikant höher als die mit 60minütigem Kreislaufstillstand (Abbildung 7.4.4).



Bei sieben Tieren traten feststellbare kardiorespiratorische Komplikationen in Form von Kammerflimmern, Fehlintubation mit inadeguater Oxygenation und Blutdruckabfall bei akuter Blutung vor oder unmittelbar nach dem Anschluss an die EKZ auf. Um den Effekt dieser vermeintlichen Ischämiephasen ohne Hypothermie zu untersuchen, wurden diese Tiere weiterhin

entsprechend unseres Protokolls an der EKZ perfundiert und einem tiefhypothermen Kreislaufstillstand unterzogen. Die Messung des Protein S-100B im Serum zeigte einen unmittelbaren abnormen Anstieg, der mit dem abnormen Verlaufsmuster bei Kindern mit definitiven neurologischen und kardiorespiratorischen Komplikationen vergleichbar ist (Abbildung 7.4.5a).

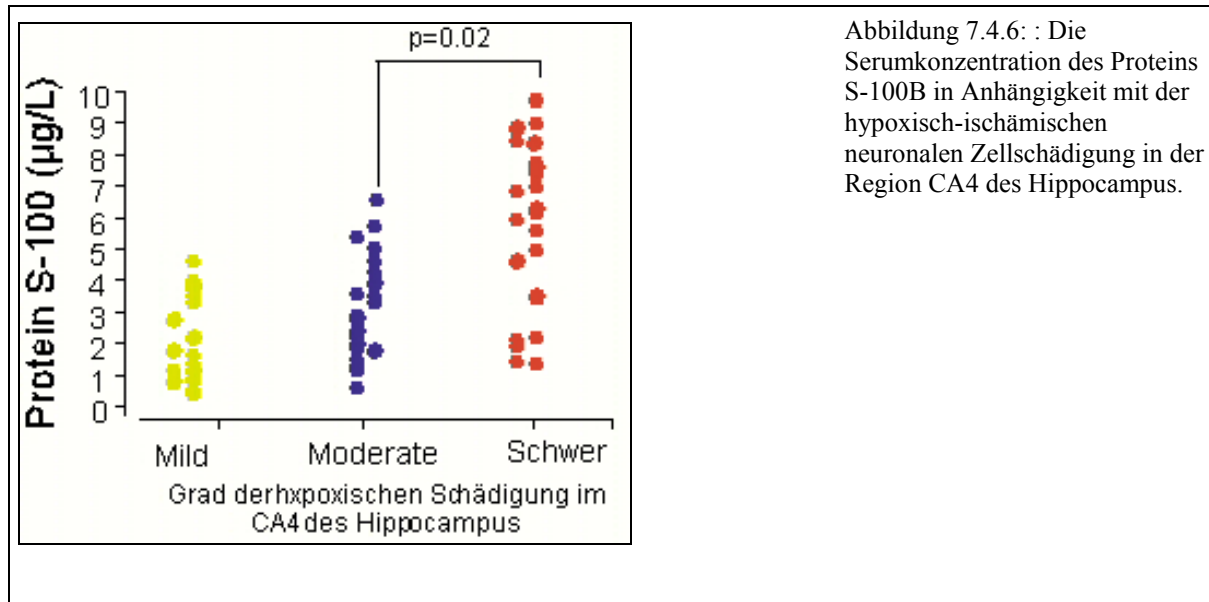


Die meisten dieser Tiere (5/7) mit einem abnormen intraoperativen Verlauf konnten aus kardialen Gründen nicht von der EKZ entwöhnt werden und wurden daher nicht weiter postoperativ entsprechend des Protokolls überwacht. Um die Durchlässigkeit der Bluthirnschranke bei den abnormen Serumwerten des S-100B qualitativ zu beurteilen, wurde Evans-Blue 15 Minuten vor Ende des Experiments systemisch verabreicht. Im Vergleich mit den anderen Tieren zeigte sich bei den Tieren mit kardiorespiratorischen

Komplikationen und begleitendem abnormen Anstieg der Serumwerte des S-100B sowohl makroskopisch als auch mikroskopisch eine deutliche inhomogene Extravasation des Farbstoffes im Cortex und Kleinhirnbereich (Abbildung 7.4.5b). Der Austritt von Evans-Blue in den extravasalen Raum weist somit auf eine signifikante erhöhte Permeabilität der Blut-Hirnschranke hin.

Um die Wertigkeit des Serumwertes des S-100B bei den Tieren mit längerer Überlebensdauer weiter zu beurteilen, wurden die maximalen postoperativen Serumwerte mit dem Grad der hypoxischen Schädigung im Gehirn korreliert. Die maximalen Serumwerte zwei Stunden nach Ende der EKZ korrelierten positiv mit der Zahl der hypoxischen Neuronen im CA4 des Hippocampus ($r=0,64$, $p=0,02$) (Abbildung 7.4.6). Nach einer Einteilung der hypoxischen Schädigung

entsprechend der Zahl der hypoxisch-nekrotischen Neuronen unterschied sich der maximale Wert des Proteins S-100B nicht zwischen milder und moderater Hypoxie, sondern nur zwischen moderater und schwerer Hypoxie. Der maximale Wert des S-100B im Serum konnte somit nur eine schwere hypoxische zerebrale Schädigung anzeigen (Abbildung 7.4.6).



Der Liquor konnte nur vor dem Experiment durch eine Lumbalpunktion und nach Ende des Experiments nach sofortiger Aspiration aus der hinteren Schädelgrube gewonnen werden. Die Ausgangskonzentration des S-100B im Liquor war signifikant höher als im Serum ($p < 0,001$). Die postoperativen Liquorwerte waren erstaunlicher-weise um das hundertfache höher als die maximalen postoperativen Serumwerte.

7.4.5. . Immunhistochemische Veränderung des Proteins S-100B

Um den Einfluss der EKZ und des tiefhypothermen Kreislaufstillstands auf die Verteilung des S-100B im Hirnparenchym zu evaluieren, wurden verschiedene Hirnareale immunhistochemisch mit dem S-100B gefärbt. Es zeigte sich eine deutliche Vermehrung der S-100B-Färbung, sowohl in den Astrogliazellen als auch im extrazellulären Raum. Im Vergleich mit den Kontrolltieren mit Scheinoperation zeigte sich die S-100B-Färbung in allen Tieren nach EKZ und tiefhypothermen Kreislaufstillstand diffus in allen Hirnarealen vermehrt (Abb. 7.4.7).

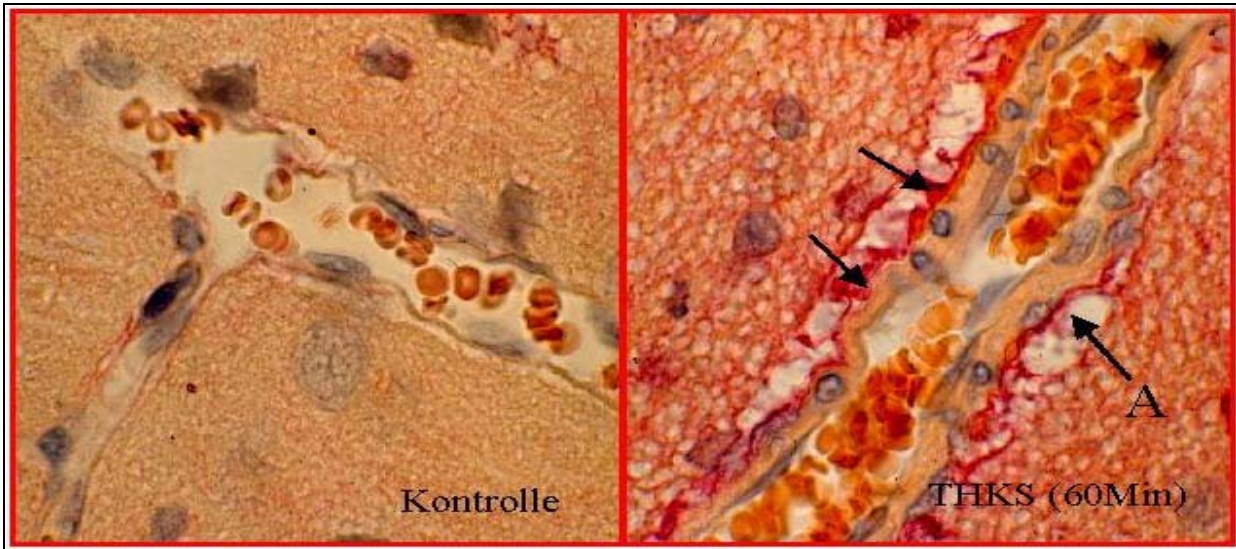


Abbildung 7.4.7: Immunhistochemische Färbung des S-100B in einem Kontrolltier mit einer Scheinoperation und einem Tier nach extrakorporaler Zirkulation und tief hypothermem Kreislaufstillstand

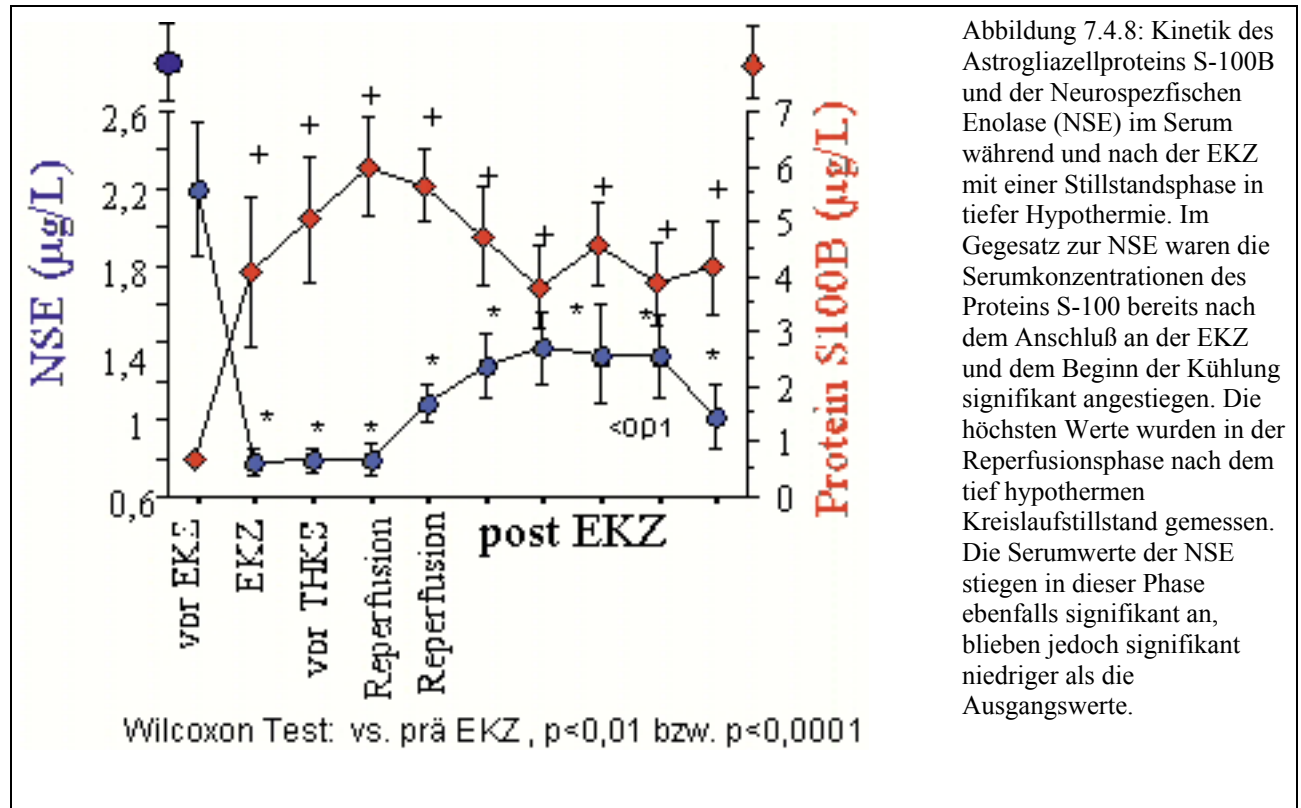
Insbesondere wurde die Färbung in den perivaskulären geschwollenen Anteilen der Astrozyten um die Venolen und Arteriolen des Hippocampus vermehrt gefunden (Abb. 7.4.7). Die Ependymzellen am Rande der Liquorräume waren ebenfalls mit S-100B intensiv gefärbt.

7.4.6. Messung der neuronalen Marker in Serum und Liquor

Zusätzlich zur Bestimmung des astroglialen Ca^{++} -bindenden Proteins S-100B wurden andere neuronale Ca^{++} -bindende Proteine wie Parvalbumin und Calretinin sowie die neurospezifische Enolase (NSE) im Serum und im Liquor bestimmt. Im Gegensatz zur Kinetik des Proteins S-100B im Serum waren die neuronalen Marker im Serum trotz des hypothermem Stillstands von zwei Stunden nicht angestiegen, sondern eher signifikant abgefallen (Abb. 7.4.8). Diese Marker sind jedoch am Ende des Experiments im Liquor im Vergleich zu den Ausgangswerten massiv angestiegen (Abb. 7.4.9).

Der Nachweis dieser Marker im Serum war trotz des massiven Anstiegs im Liquor nicht möglich (Abb. 7.4.8). Die Konzentrationen dieser Marker waren im Vergleich mit denen von S-100B im Serum eher abgefallen, möglicherweise durch Hämodilution der bereits vorhandenen Konzentrationen im Serum nach Beginn der EKZ mit Verdreifachung des zirkulierenden Blutvolumen im Tier und EKZ Kreislauf (Abb. 7.4.8). Der kontinuierliche Anstieg der Serumwerte des Astrogliazellproteins S-100B, im Gegensatz zu den neuronalen Markern NSE,

Parvalbumin und Calretinin, weist somit auf eine Durchlässigkeit der Bluthirnschranke für S-100B hin.



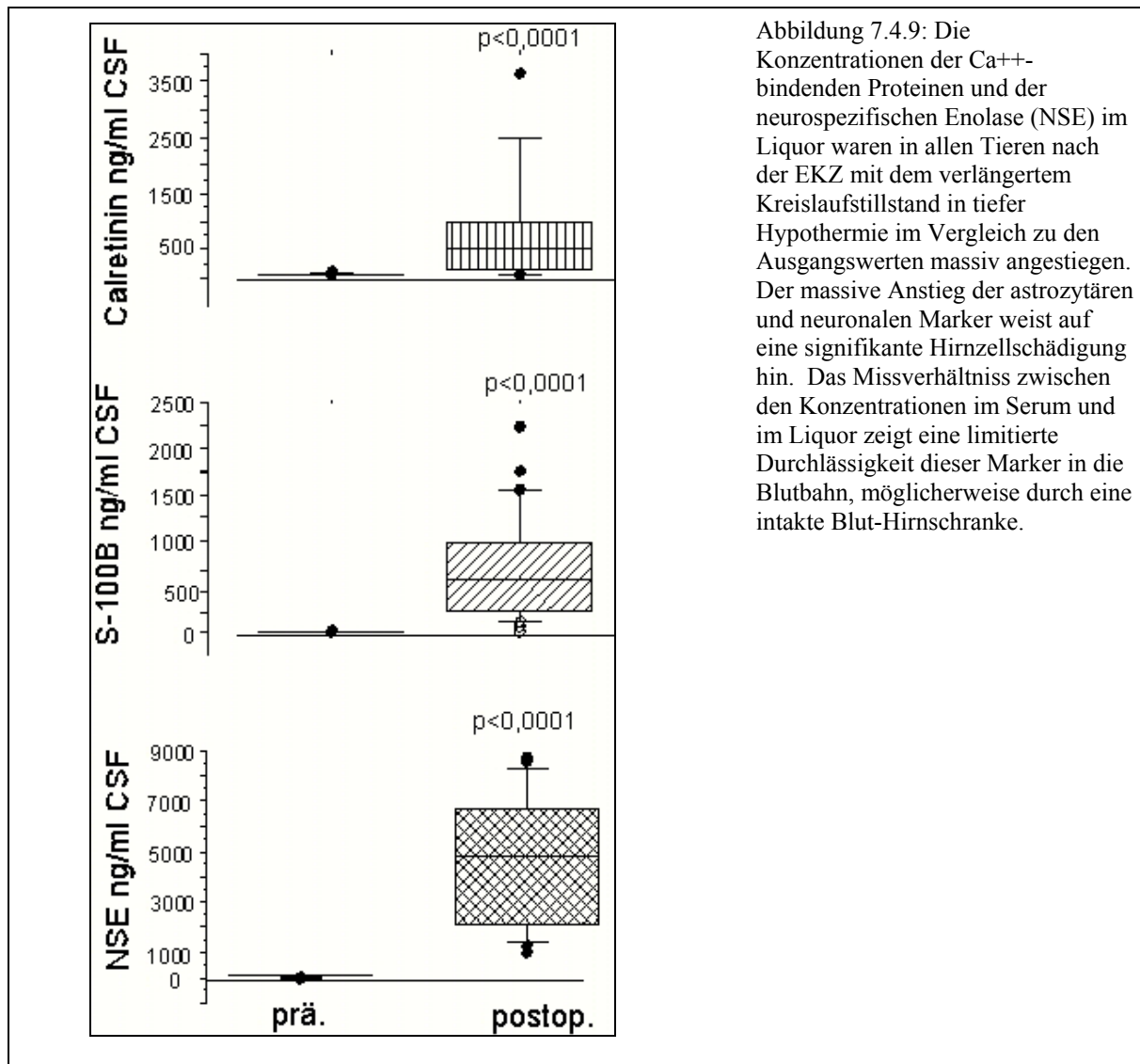
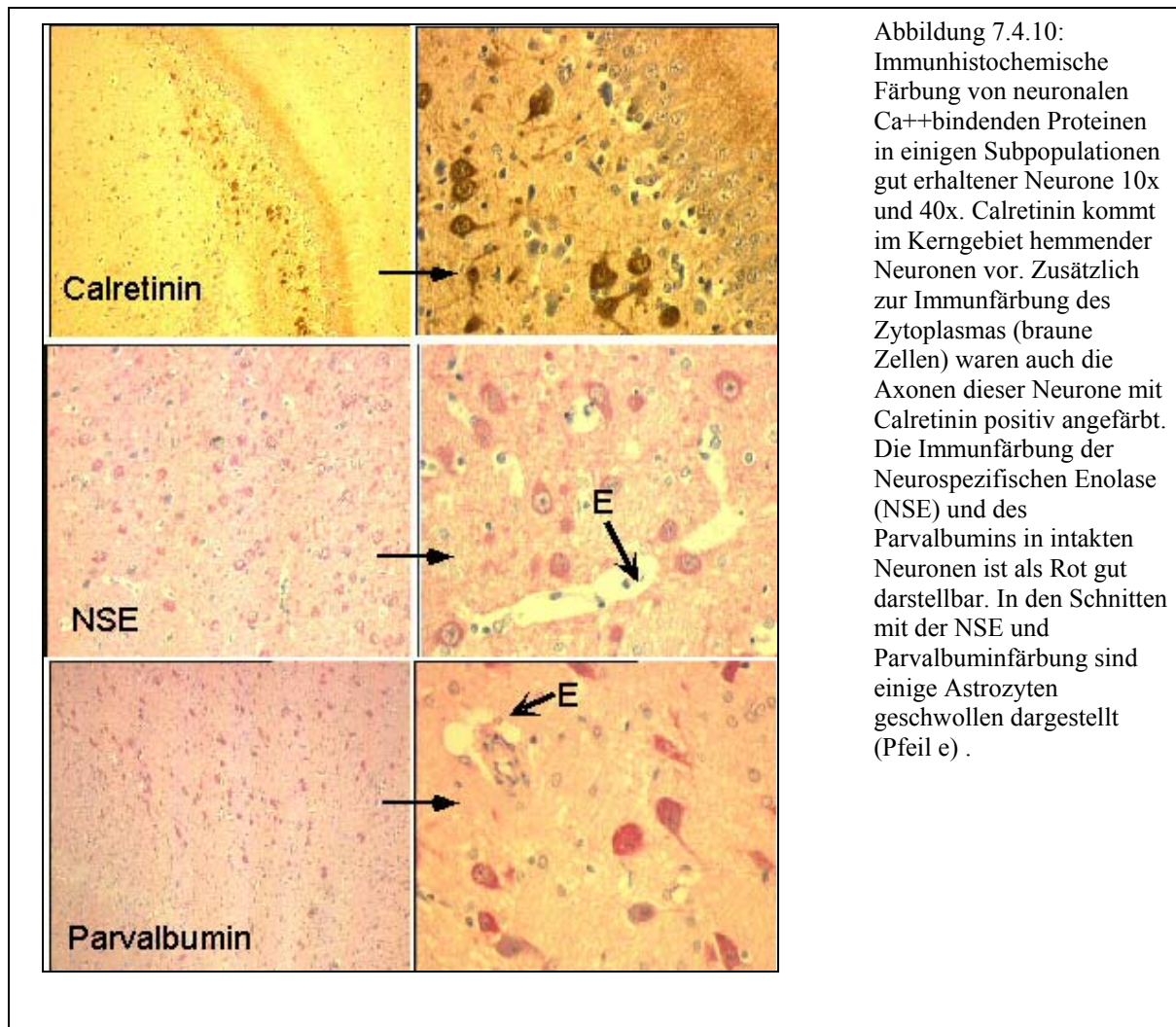


Abbildung 7.4.9: Die Konzentrationen der Ca^{++} -bindenden Proteinen und der neurospezifischen Enolase (NSE) im Liquor waren in allen Tieren nach der EKZ mit dem verlängertem Kreislaufstillstand in tiefer Hypothermie im Vergleich zu den Ausgangswerten massiv angestiegen. Der massive Anstieg der astrozytären und neuronalen Marker weist auf eine signifikante Hirnzellschädigung hin. Das Missverhältniss zwischen den Konzentrationen im Serum und im Liquor zeigt eine limitierte Durchlässigkeit dieser Marker in die Blutbahn, möglicherweise durch eine intakte Blut-Hirnschranke.

7.4.7. Immunhistochemischer Nachweis der neuronalen Marker im Zentralnervensystem



Die NSE, Parvalbumin und Calretinin wurden in verschiedenen nicht-hypoxischen Neuronen nachgewiesen. In den hypoxischen Neuronen war die immun-histochemische Färbung für Parvalbumin und NSE verblasst und nicht mehr im Zytoplasma der hypoxischen Neuronen nachweisbar (Abb. 7.4.10). Parvalbumin und Calretinin waren in einigen Subpopulationen von Kerngebieten außerhalb des Hippocampus vermehrt gefunden worden. Im Gegensatz zu der Immunfärbung von S-100B war die Färbung der neuralen Marker auf das Zytoplasma der Neuronen beschränkt. In den 3 Färbungen sind ausschließlich intakte Neurone mit Immunfärbung der Ca⁺⁺bindenden Proteinen im Zytoplasma der Zellen dargestellt. In einigen Schnitten ist die astrozytäre Schwellung insbesondere in perivaskulären Regionen zu sehen (Abb.7.4.4).

8. Neuroprotektive Strategien durch Vorbehandlung mit verschiedenen Pharmaka an einem Schweinemodell

Neuroprotektive Strategien in der klinischen Praxis erfordern im Tiermodell eine Evaluierung pathophysiologischer Zusammenhänge, die zu einer neuronalen Schädigung führen^{145,206,234-238}.

Mehrere hämodynamische und pharmakologische Maßnahmen wurden in den letzten acht Jahren anhand klinischer und tierexperimenteller Untersuchungen erprobt und trugen zur Verbesserung der Perfusionsmethoden während herzchirurgischer Operationen bei Kindern und Säuglingen bei^{38,54,93-95,122,186,239-241}. Im Gegensatz zu den Zuständen mit hypoxisch-ischämischen Ereignissen, wo erst Stunden nach einem Ereignis die unmittelbaren und späteren Folgen behandelt werden, besteht bei Risikokindern mit einer geplanten Operation am offenen Herzen in tiefhypothermem Kreislaufstillstand, neben komplettem Monitoring der zerebralen Oxygenation und Perfusion zusätzlich die Möglichkeit, durch Vorbehandlung mit bestimmten Pharmaka die Entstehung möglicher zerebraler Schäden präoperativ entscheidend zu beeinflussen.

Dieses Versuchsmodell wurde mit dem Ziel einer Optimierung der Perfusionsmethoden mit Minimierung zerebraler Schäden entwickelt. Viele Pharmaka, die vor und nach solchen extremen Situationen wie die hypotherme Perfusion oder der Kreislaufstillstand routinemäßig eingesetzt werden, sind auf ihre Wirkung im Zentralnervensystem nicht gänzlich untersucht.

8.1. Vorbehandlung mit hoch dosierten Steroiden

Die Rolle der Steroide zur Protektion neuronaler Schädigung und Vorbeugung und Behandlung von Permeabilitätsstörungen und Ödembildung nach einem traumatischen Eingriff im Gehirn wird jedoch seit langem kontrovers diskutiert^{6,242-248}. Vor oder während der extrakorporalen Zirkulation ist die Vorbehandlung mit Steroiden eine routinemäßige Methode zur Prävention potentieller Hirnschwellung während Korrekturoperationen angeborener Herzfehler im Neugeborenenalter^{6,93,233,249}. Kontrollierte klinische Studien hinsichtlich des neuroprotektiven Effektes fehlen.

Lodge und Mitarbeiter von der Duke-Universität in North Carolina berichteten vor kurzem über eine Reduktion der Immunantwort nach der Vorbehandlung mit hochdosierten Steroiden acht Stunden vor der EKZ in einem neonatalen Schweinemodell im Vergleich zu der herkömmlichen intraoperativen Applikation in die Primeflüssigkeit⁸⁴.

Die präoperative Applikation führte zu einer verbesserten Lungenfunktion durch verminderte pulmonale Wasserakkumulation. Zusätzlich zeigte die gleiche Arbeitsgruppe eine verbesserte

Hirnperfusion und eine verbesserte zerebrale metabolische Rate für Sauerstoff in der Reperfusionsphase nach der Vorbehandlung mit hochdosierten Steroiden⁹³. Eine histopathologische Evaluierung der neuronalen Schädigung wurde jedoch nicht durchgeführt⁹³. Auf der anderen Seite haben interessanterweise die meisten klinischen Doppelblindstudien keinen klinischen Vorteil der Vorbehandlung mit Steroiden gezeigt²⁵⁰.

An unserem Bypassmodell mit einer tiefhypothermen Ischämie in neonatalen Schweinen wurde der vermeintlich protektive Effekt der Vorbehandlung mit hochdosierten Steroiden auf die zerebrale Oxygenation, Perfusion und vor allem auf die morphologischen Veränderungen im Gehirn untersucht.

8.1.1. Methode

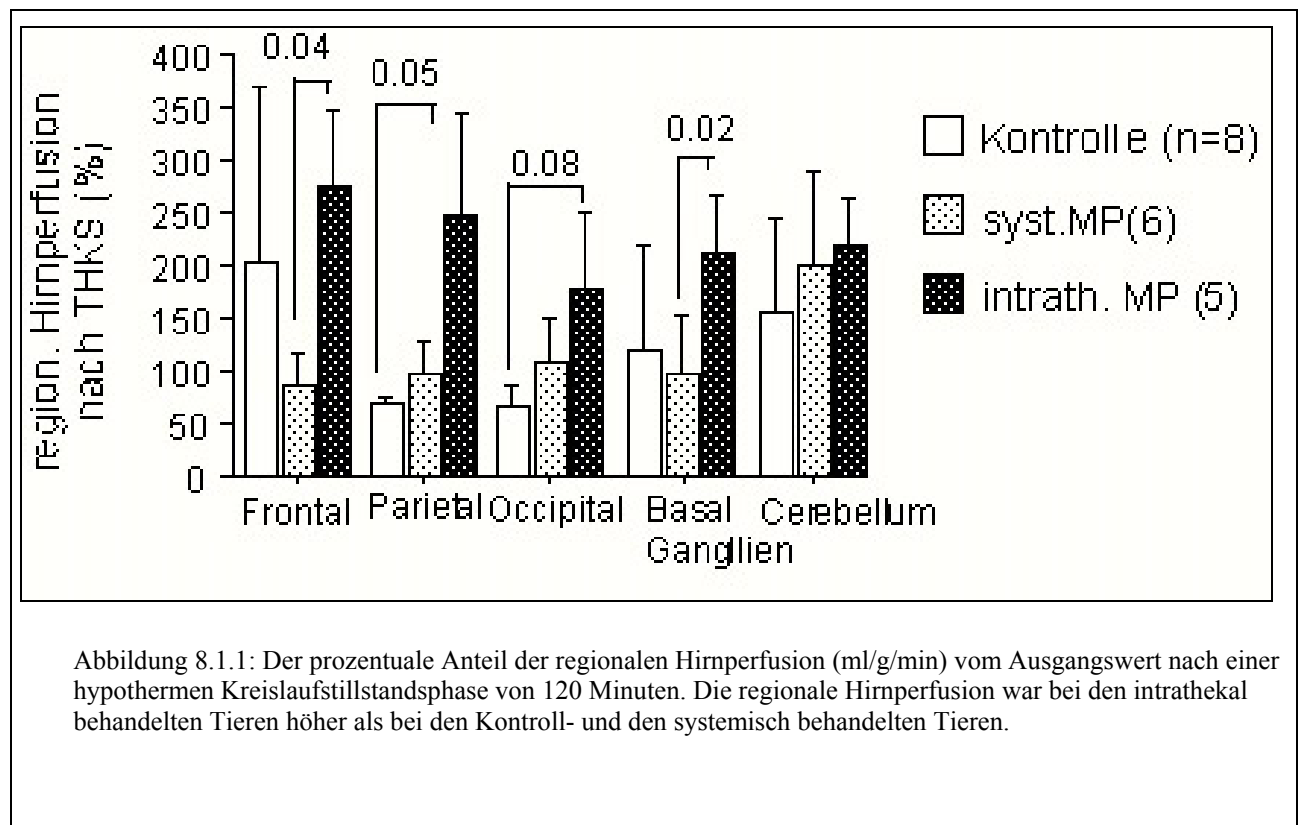
Achtzehn neugeborene Ferkel im Alter von weniger als einer Woche wurden um ca. 8:30 Uhr am Tag des Versuches in die tierexperimentelle Einrichtung der Charité, Campus-Virchow Klinikum, eingeliefert. Die Tiere wurden in eine Kontrollgruppe (n=8) und in eine Gruppe (n=5) mit systemischer Steroidvorbehandlung mit Methylprednisolon (Urbason Methylprednisolone-21-hydrogen Succinate, Hoechst) unterteilt. Bei den systemisch vorbehandelten Tieren wurde 24 Std. und 5 Std. vor dem Operationsbeginn 30mg/kg Methylprednisolon intraperitoneal verabreicht. Bei fünf Tieren wurde nach einer Lumbalpunktion und Gewinnung von 0,5 ml Liquor eine Methylprednisolongabe von 30 mg/kg in den intrathekalen Raum injiziert. Die Vorbereitung, Anästhesieeinleitung, Perfusion der EKZ, Neuromonitoring sowie histologische Bearbeitung erfolgte nach dem im Abschnitt 6.1 beschriebenen Protokoll.

8.1.2. Ergebnisse

8.1.2.1. Evaluierung der regionalen Hirnperfusion mittels Mikrosphären

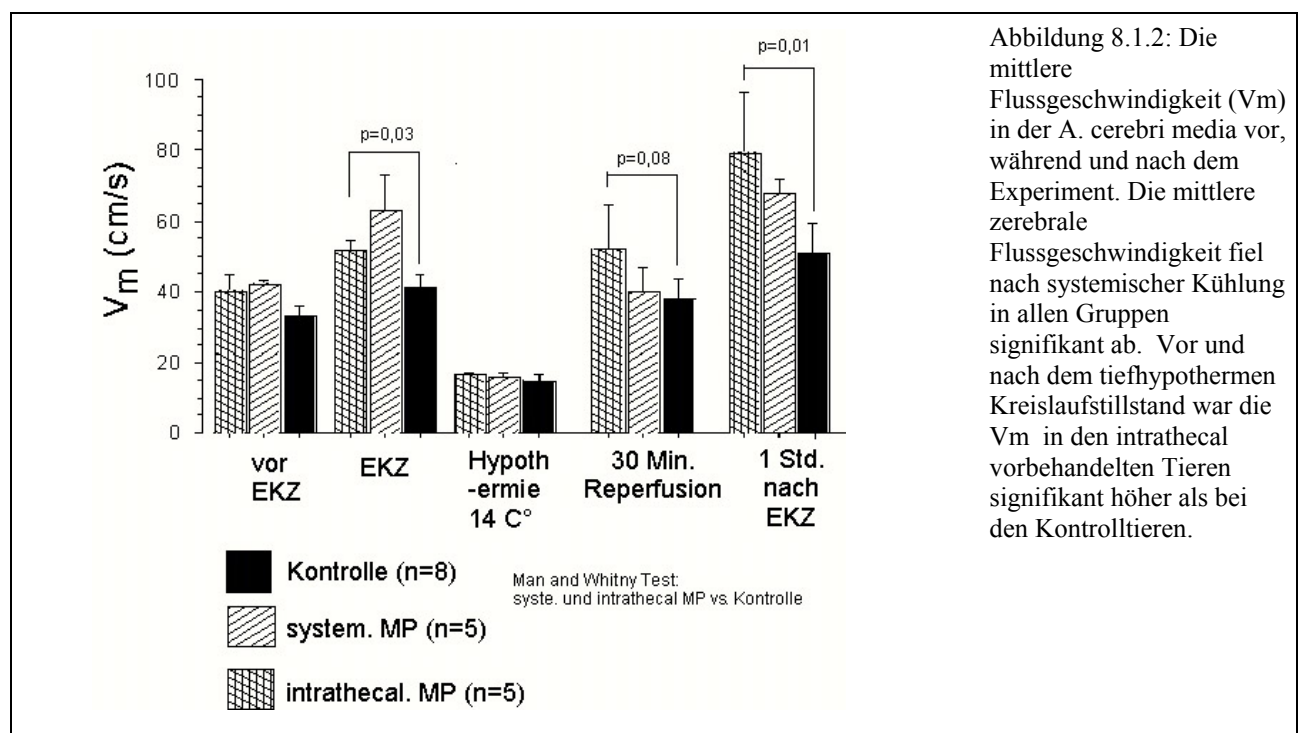
In beiden Gruppen kam es während der Kühlungsphase zu einer signifikanten Reduktion der Hirnperfusion um 30-40% des Ausgangswertes. Nach dem tiefhypothermen Kreislaufstillstand (THKS) und einer Erwärmungsphase von 60 Minuten normalisierte sich die Hirnperfusion zu den präoperativen Werten. In einigen Hirnregionen erreichte die regionale Perfusion jedoch noch höhere Werte als die Ausgangswerte ($p < 0,01$) (Abb. 8.1.1).

Nach der Erwärmung und Reperfusion zeigte sich jedoch eine Hyperperfusion bei den mit Methylprednisolon intrathekal vorbehandelten Tieren um 250 % des Ausgangswertes (Abb. 8.1.1). Die vorbehandelten Tiere zeigten eine signifikant höhere zerebrale Perfusion im Vergleich mit der Kontrollgruppe.



8.1.2.2. Evaluierung der regionalen Hirnperfusion mittels TCD

Die zerebrale Flussgeschwindigkeit wurde mittels transkranieller Dopplersonographie kontinuierlich registriert (siehe 3.1 und 6.1.3.1). Auch diese Methode zeigte einen ähnlichen Änderungstrend in der mittleren Flussgeschwindigkeit während der Kühlung und der Reperfusion nach dem Kreislaufstillstand (Abb. 8.1.2).

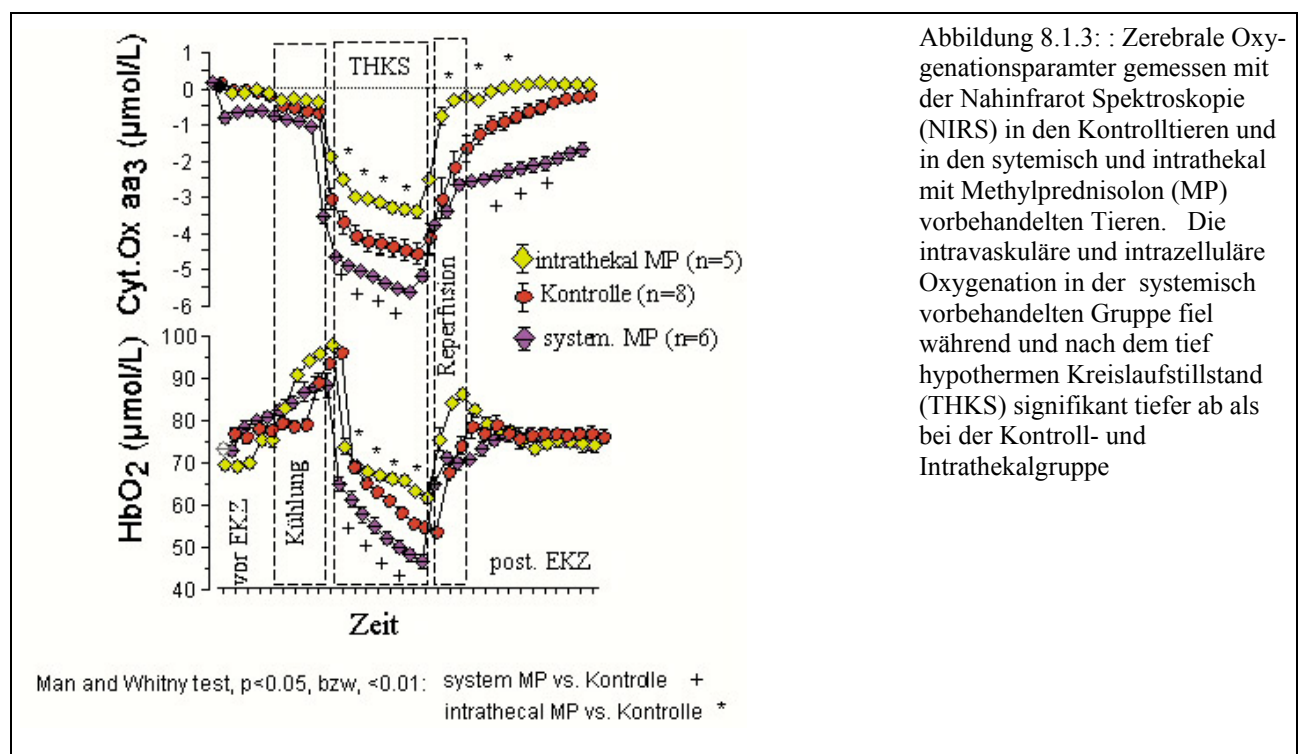


8.1.2.3. Zerebrale Oxygenation

Die Veränderungen von Konzentrationen des oxygenierten (HbO_2) und desoxygenierten Hämoglobin (HHb) sowie der Cytochromoxydase aa_3 (Cyt.Ox aa_3) wurden mit einem Zerebraloxymeter (Criticon, Johnson&Johnson) online registriert.

In allen 3 Gruppen wurde ein Veränderungsmuster der intravaskulären und intrazellulären Oxygenationsparameter entsprechend der Kühlung und Unterbrechung der Zirkulation im tiefhypothermen Kreislaufstillstand festgestellt. Die intravaskulären und intrazellulären Oxygenationssignale der zerebralen Oxygenation unterschieden sich jedoch während der systemischen Kühlung und vor allem während des tiefhypothermen Kreislaufstillstandes, entsprechend des Modus der Steroidapplikation signifikant von der Kontrollgruppe (Abb. 8.1.3). Das Cyt.Ox aa_3 -Signal der intrazellulären Oxygenation in den intrathekal vorbehandelten Tieren fiel langsamer und signifikant weniger ab als in der Kontrollgruppe und den systemisch vorbehandelten Tieren, sowohl während als auch nach dem tief hypothermen Kreislaufstillstand (THKS) (Abb. 8.1.3).

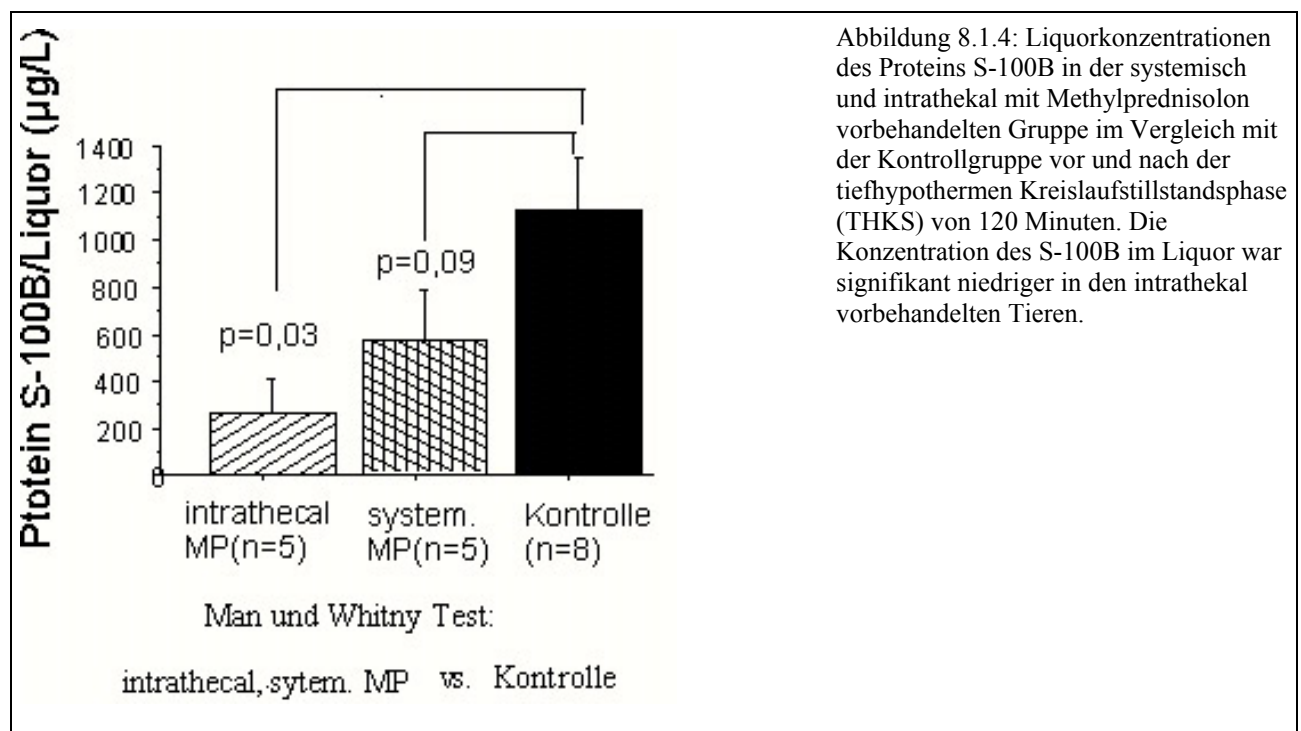
Die systemisch vorbehandelten Tiere hatten im Vergleich mit der Kontroll- und Intrathekalgruppe eher signifikant schlechtere intrazelluläre Oxygenationsparameter während und nach dem tiefhypothermen Kreislaufstillstand. Während das intravaskuläre oxygenierte Hämoglobin den Ausgangswert vor der EKZ erreichte, blieb das intrazelluläre Cyt.Ox aa_3 -Signal in den systemisch vorbehandelten und in den Kontrolltieren signifikant unter den präoperativen Werten (Abb. 8.1.3).



8.1.2.4. Biochemische Marker

In allen Versuchstieren wurde nach dem Kreislaufstillstand in tiefer Hypothermie ein signifikanter Anstieg des astroglialen Zellproteins S-100B im Serum gemessen (Abbildung 8.1.4-). Bereits nach Anschluss an die EKZ zeigte sich eine Erhöhung des Protein S-100B im Serum in beiden Gruppen. Der maximale Wert wurde wie in den vorausgegangenen Untersuchungen nach Ende der EKZ erreicht. Während sich bei den Kontrolltieren die Serumwerte des S-100B sich denen der Ausgangswerte vor der EKZ annäherten, zeigte sich in den steroidvorbehandelten Tieren ein noch persistierender Anstieg der S-100-Werte (Abbildung 8.1.4). Die Serumkonzentrationen der NSE fielen ab und unterschieden sich nicht signifikant untereinander (Abbildung 8.1.4). Der Abfall nach dem verlängerten Kreislaufstillstand ist möglicherweise Ausdruck einer Verdünnung der vorhandenen Konzentrationen ohne weitere Freisetzung aus dem Gehirn.

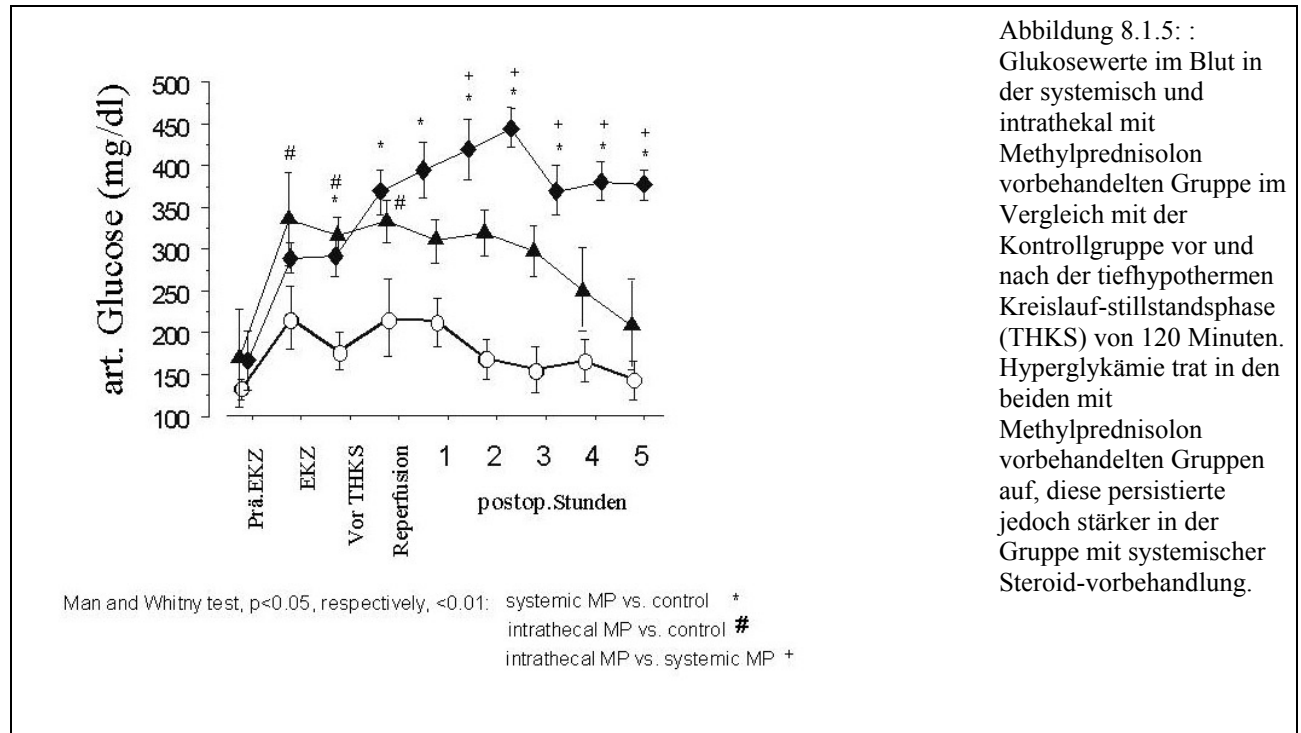
Die Konzentrationen des astroglialen Proteins S-100B im gewonnenen Liquor aus der hinteren Schädelgrube unmittelbar nach Öffnung des Schädels waren jedoch signifikant geringer nur in den intrathekal vorbehandelten Tieren (Abbildung 8.1.4).



Die Konzentrationen der neuronalen Marker im Serum waren nicht signifikant angestiegen. Im Gegensatz stieg die Konzentrationen der neuronalen Marker NSE und Calretinin im Liquor signifikant an. Die Konzentrationen in den Kontrolltieren und in den systemisch und intrathekal mit Methylprednisolon behandelten Tieren zeigten jedoch keinen signifikanten Unterschied.

8.1.2.5. Hyperglykämie

Die Glucosekonzentration im Serum stieg bei allen Tieren mit Beginn der EKZ an. Beiden Gruppen, die mit systemischer und die mit intrathekaler Vorbehandlung mit MP zeigten signifikant höhere Glucosewerte im Blut als die Kontrollgruppe, sowohl vor als auch nach dem Kreislaufstillstand in tiefer Hypothermie. Die Hyperglykämie persistierte jedoch während der postoperativen Phase nur in den systemisch mit MP vorbehandelten Tieren (Abbildung 8.1.5).



8.1.2.6. Auswertung der hypoxisch und apoptotischen neuronalen Zellschädigung

Die quantitative Auswertung der hypoxisch-nekrotischen neuronalen Zellschädigung und Ausmaß der Verminderung dieser Schädigung durch die Vorbehandlung mit MP wurde in allen Regionen des Hippocampus sowie immm frontalen Gyrus cinguli durchgeführt. Es zeigte sich keinerlei Verbesserung der hypoxischen Zellschädigung in allen Hippocampusregionen (Abbildung 8.1.6). Der Grad der hypoxischen Schädigung war sogar signifikant höher in CA1 im Vergleich zu den Tieren ohne Vorbehandlung ($p=0,02$). Die intrathekale Vorbehandlung mit MP, unter Umgehung der Blut-Hirnschranke, zeigte eine signifikante Reduktion der hypoxisch-ischämischen Neuronen in den Hippocampusregionen CA1 und CA4 (Abbildung 8.1.6). Die Abnahme der ischämischen Schädigung in den anderen Hippocampusregionen und im Gyrus cinguli des frontalen Hirns erreichte jedoch keine statistisch signifikante Besserung.

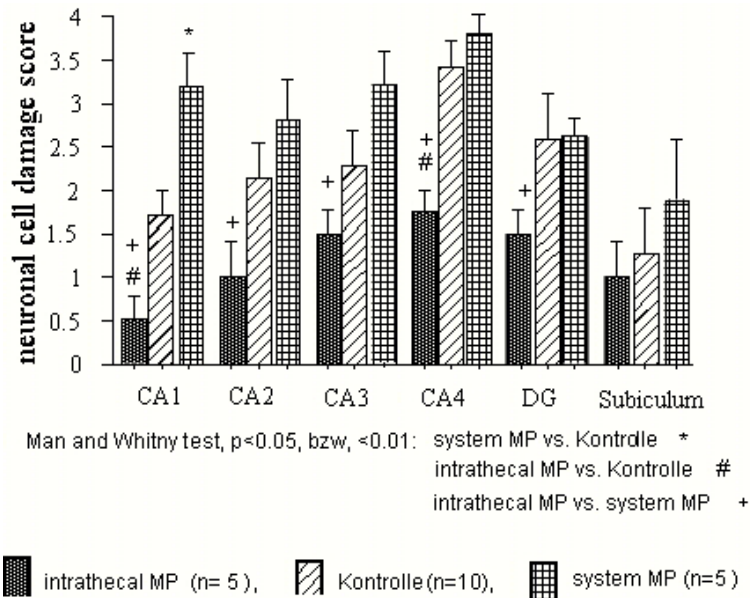


Abbildung 8.1.6: Die quantitativen neuropathologischen Veränderungen in Hippocampus-regionen bei den mit Methyl-prednisolon vorbehandelten Tieren. Die intrathekale und nicht die systemische Vorbehandlung mit MP scheint einen neuroprotektiven Effekt nach einer hypothermen Kreislaufstillstandsphase von 120 Minuten im Hippocampus zu entfalten.

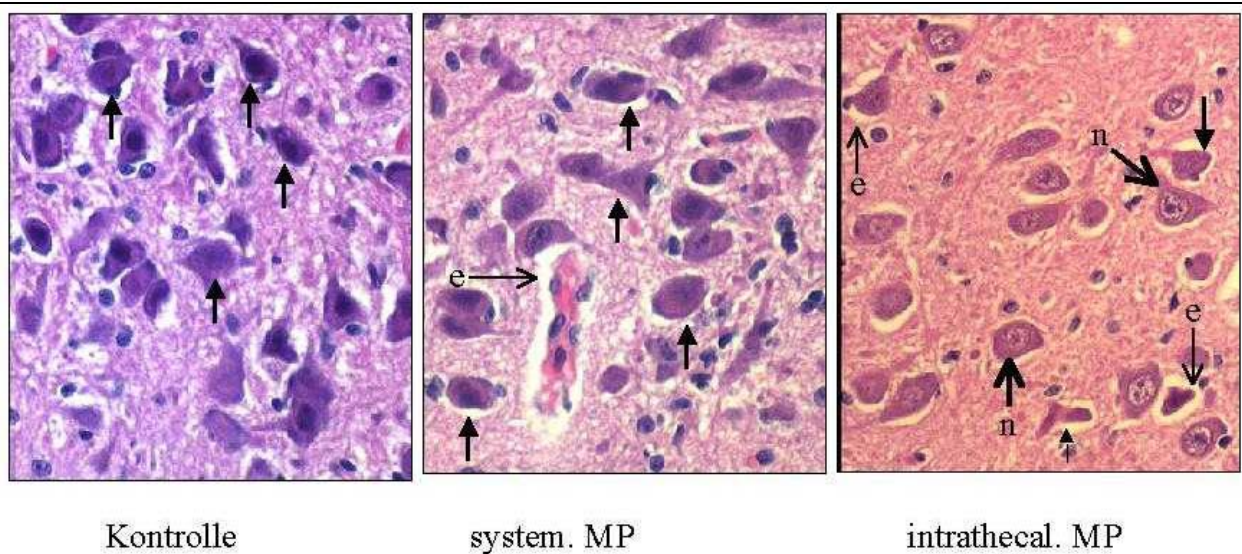


Abbildung 8.1.7: Paraffinschnitt in CA4 zeigt eine signifikante Reduktion der hypoxisch nekrotischen Neuronen in CA4 des Hippocampus. Der hypoxisch bedingte nekrotische Zelltod ist lichtmikroskopisch charakterisiert durch Eosinophilie des Zytoplasmas, Zellschrumpfung und Kernveränderungen in Form von Kernpyknose und Kernbasophilie (Pfeil). Perivaskuläres und perineurales Ödem wurde in allen Tieren mit und ohne Vorbehandlung gleichermaßen beobachtet (e Pfeil).

Apoptotische Neurone wurden in allen Regionen vereinzelt beobachtet. Für die Auswertung der Apoptose wurden sowohl HE- als auch TUNEL-gefärbte Schnitte ausgewertet (Abbildung 8.1.7).

Die morphologischen Aspekte der Apoptose wie Chromatin-Kondensation wurden weiter in Semi-dünnschnitten bestätigt (Abbildung 8.1.8). Apoptotische und TUNEL-positive Neurone wurden in großer Zahl überwiegend im Gyrus dentatus des Hippocampus gefunden. Die Anzahl apoptotisch veränderter und TUNEL-positiver Neurone war in den beiden mit MP vorbehandelten Gruppen signifikant höher als in der Kontrollgruppe (Abbildung 8.1.8).

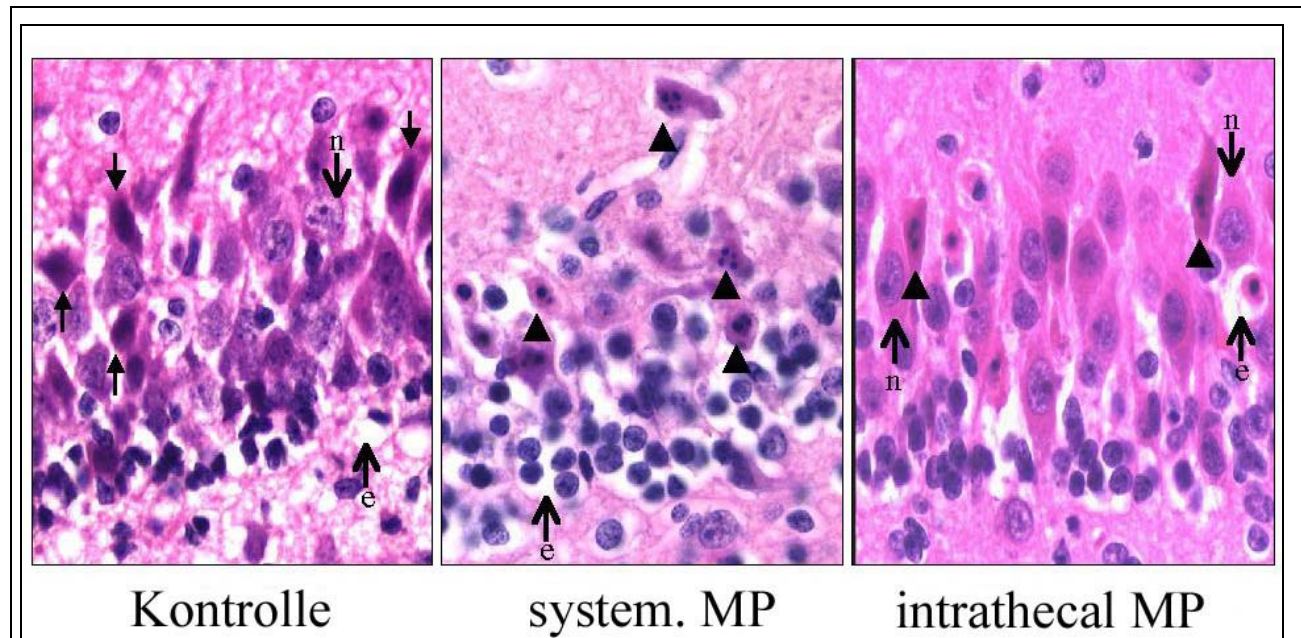
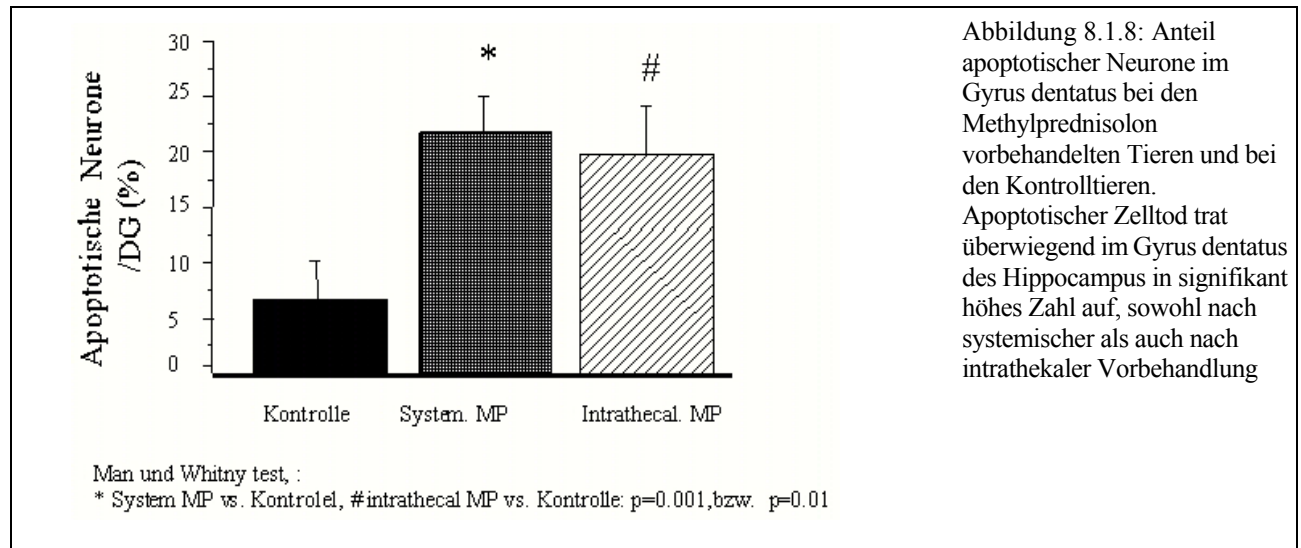
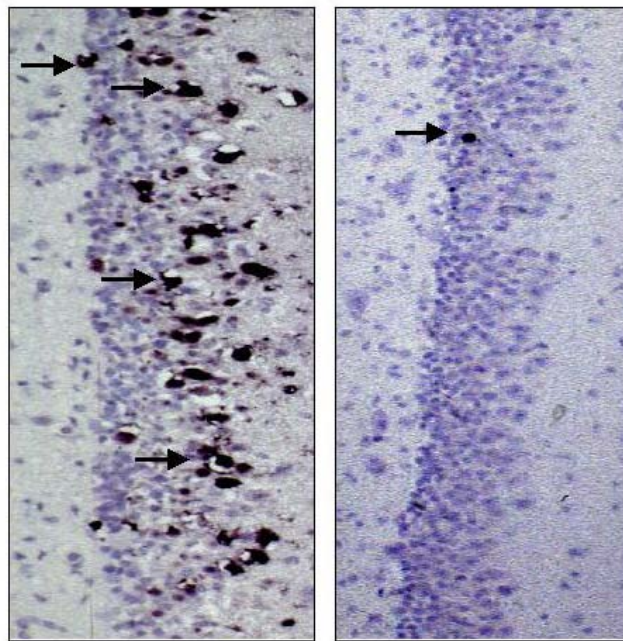


Abbildung 8.1.9 Die Apoptose fand sich überwiegend regional im Gyrus dentatus des Hippocampus. Ein Paraffinschnitt des Gyrus dentatus zeigt lichtmikroskopisch neben den normalen (Pfeil n), und den hypoxisch nekrotischen Neuronen (Pfeil), apoptotische Neurone charakterisiert durch Kondensation des nuklearen Chromatins bei gleichzeitiger Erhaltung des Zellkörpers (Pfeilkopf). Haematoxylin und Eosin (HE, 40X).



System. MP
(TUNEL)

Kontrolle
(TUNEL)

Abbildung 8.1.10: Die Apoptose in den Neuronen wurde ebenfalls nach der TUNEL-Methode (terminal transferase-mediated dUTP-digoxigenin nick end-labeling) gefärbt und bestätigt. Der fragmentierte DNA-Kerninhalt erscheint als dunkle Chromatin-Körperchen oder apoptotic bodies

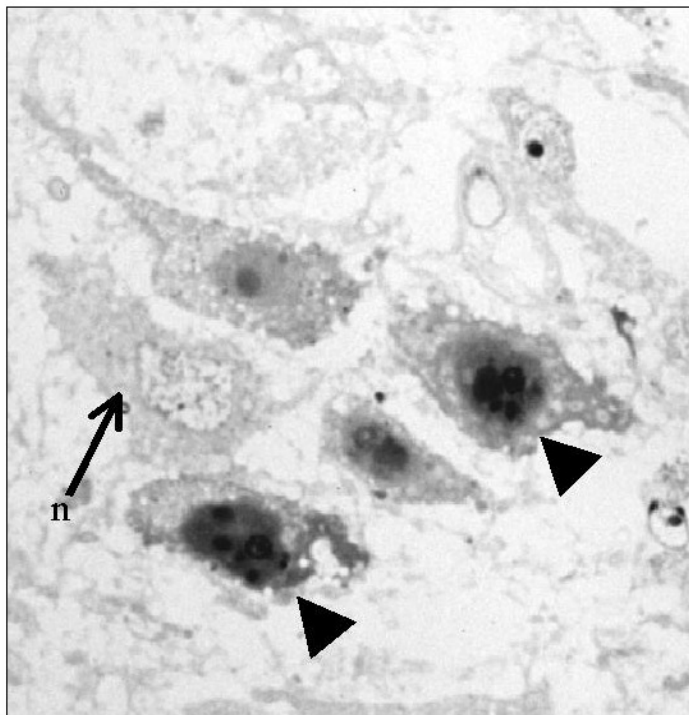


Abbildung 8.1.11: Die Morphologie der Apoptose wurde zusätzlich in Semi-Dünnschnitten beurteilt und bestätigt. Die apoptotischen Neurone zeigten Zellschrumpfung unter Erhalt der Zellmembran, mit charakteristischen Kernveränderungen in Form von Heterochromatisation bzw. Kondensation des Kerninhalts (DNA-Fragmentation) (Pfeilkopf). Im Vergleich ist daneben ein gut erhaltener benachbarter Neuron zu sehen (Pfeil n).

8.2. Die Rolle des Cyclosporins und des FK506 im Zentralnervensystem

Cyclosporin A (CsA) und FK506 sind immunsuppressive Medikamente, welche seit der Aera der Organtransplantation in der klinischen Praxis eine breite Anwendung finden. Beide Medikamente haben im Immunsystem eine antimitotische Wirkung, um die Vermehrung der T-Zellen und damit die Immunantwort auf körperfremde Antigene zu hemmen²⁵¹. Cyclosporin A und FK506 entfalten ihre Wirkung durch die Bindung an intrazelluläre kleine Rezeptorproteine, den Immunophilinen, die auch als Cyclophiline oder FK-Bindungsproteine, für FK 506 das Protein12 (FKBP-12), bekannt sind²⁵¹ (Abb. 8.2-1).

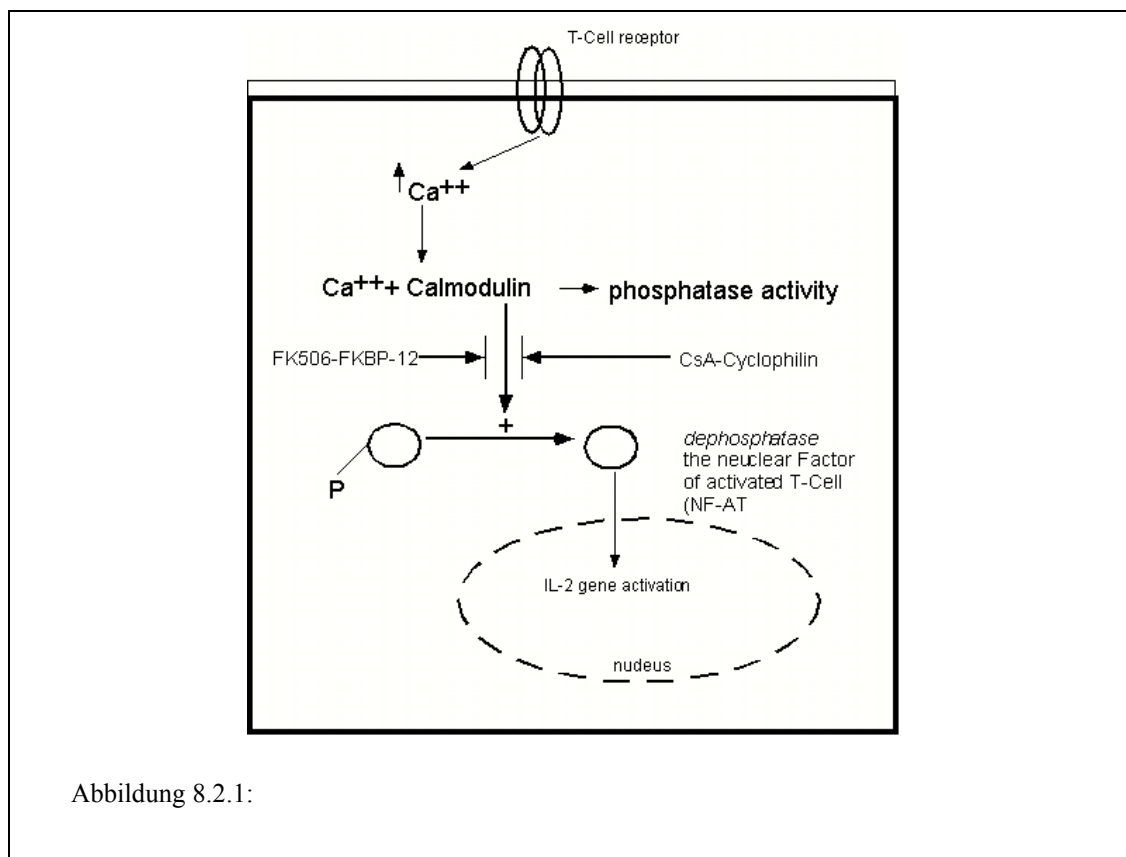


Abbildung 8.2.1:

Lui et al, Friedman und Weissman identifizierten das Zielimmunophilin von CsA und FK506 und zeigten dass die Komplexe CsA-Cyclophilin A und FK506-FK-BP eine Wechselwirkung mit Calcineurin, einer Ca-Calmodulin abhängigen Proteinphosphatase, haben^{252,253}. Eine der Wirkungsziele des Calcineurins ist die phosphorylierte Form eines Transkriptionsfaktors, *die nuclear factor of activated T cells* (NF-AT), welche die Transkription verschiedener Gene einschließlich IL-2 im Nucleus der T Zellen aktivieren (Abb. 8.2-1).

Um in den Nucleus der T-Zelle einzudringen und die IL-2 Transkription zu beeinflussen, muss das NF-AT de-phosphoryliert werden. Eine Bindung der Komplexe CsA-Cyclophilin oder FK506-

FKBP-12 mit dem Calcineurin inhibiert seine Phosphataseaktivität. Dies führt dann zu einer fehlenden Dephosphorylierung des NF-AT, welches in dieser Form nicht in den Nucleus eindringen kann, wodurch dort eine Gentranskription von proinflammatorischen Interleukinen ausbleibt ²⁵⁴.

Die überwiegende Mehrheit der Forschung mit den Immunophilinen und ihren Rezeptoren beschäftigte sich mit den Immunophilinen im Lymphozyten des Immunsystems ²⁵⁴. Überraschende Ergebnisse Anfang und Mitte der neunziger Jahre zeigten jedoch, dass die Konzentrationen der Immunophiline Cyclophilin und FKBP-12 im neuronalen Gewebe fünfzigfach höher sind als im Immunsystem ²⁵⁵. Die zunehmenden Ergebnisse über das reichliche Vorkommen von Immunophilinen im Zentralnervensystem lenkte das Interesse auf die Funktion und die Rolle der Immunophiline in den Neuronen des Zentralnervensystems ^{251,254-256}.

Mit der zunehmenden Anwendung von Cyclosporin und FK506 häufen sich auch Berichte über assoziierte zerebrale Nebeneffekte wie Enzephalopathien, Krämpfe und kognitive Veränderungen nach Organtransplantation ^{257 258}. Seit Mitte der neunziger Jahre haben auf der anderen Seite mehrere experimentelle Studien die Rolle von FK506 und CsA in unterschiedlichen Modellen zur zerebralen Ischämie und Reperfusion untersucht und überwiegend einen protektiven Effekt gegen der ischämischen neuronalen nekrotischen Schädigung festgestellt ²⁵⁹⁻²⁶². Aufgrund der Multimorbidität und der unterschiedlichen Risikofaktoren ist die Ursache der neurologischen und kognitiven Veränderungen bei Kindern und Erwachsenen nach Organtransplantation multifaktoriell und nicht alleine auf die Medikation mit Cyclosporin und FK506 zurückzuführen ²⁵⁷.

Obwohl die Penetration und Passage von Cyclosporin durch die Blut-Hirnschranke limitiert ist ²⁶³⁻²⁶⁵, zeigte sich eine pharmakologisch wirksame intrazerebrale Konzentration im Gehirn durch Erhöhung der systemisch verabreichten Dosis ²⁶⁶⁻²⁶⁸.

Deswegen wurde eine höhere Dosierung einer Einzeldosis von 60 mg/kg in unserem neonatalen Schweinmodell verabreicht, um einen möglichen protektiven Effekt histologisch nachzuweisen ^{267,268}.

FK506 hemmt, durch die Bindung an seinen Liganden FKBP-12, die De-phosphorylierung der NO-Synthetase und damit die Umwandlung in ihre aktive Form ^{269,270}. Damit wird eine Neurotoxizität durch neu gebildetes NO verhindert ²⁷⁰ (Abb. 8.2-2).

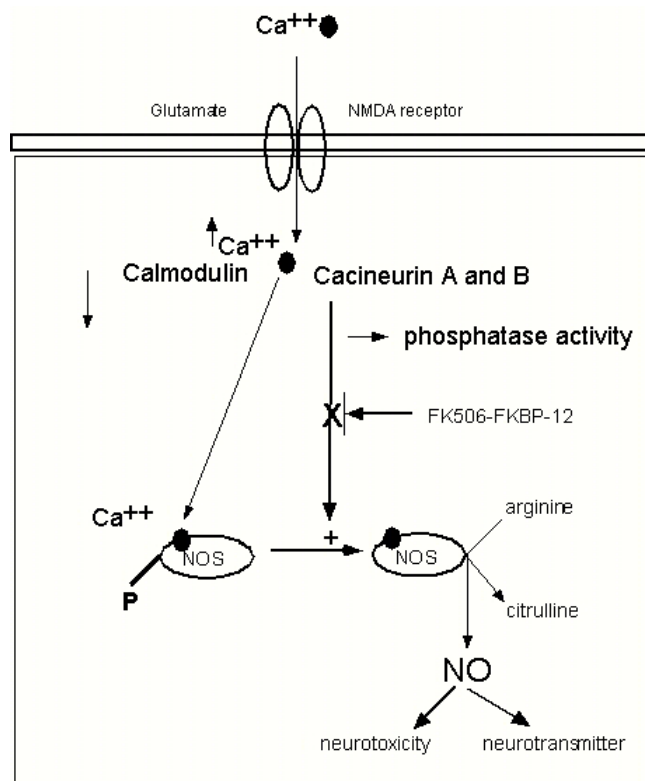


Abbildung 8.2.2:

Auch FK506 selbst als ein Ca^{2+} /Calmodulin-abhängiger Phosphatase-2B-Inhibitor²⁷¹ scheint bei der Glutamat-Neurotoxizität und NMDA-Rezeptorenaktivierung nach einer vorausgegangenen Ischämie eine protektive Rolle zu spielen^{271,272}. Außerdem zeigte FK506 eine Erhaltung - Bindungskapazität für cAMP und damit eine Erhaltung der intrazellulären Signaltransduktion²⁷¹.

Aufgrund dieser Untersuchungen soll die Wirkung der zwei zuvor beschriebenen Medikamente auf das Zentralnervensystem bei kardiochirurgischen Eingriffen an neugeborenen Ferkeln unter Verwendung der EKZ mit tiefhypothermem Kreislaufstillstand evaluiert werden.

8.2.1. Methode

Um eine histologisch sichtbare Ischämie nach sechsständiger Reperfusion zu erreichen, wurde die Kreislaufstillstandsphase in tiefer Hypothermie auf zwei Stunden ausgedehnt. Die Durchführung der Experimente erfolgte einheitlich nach unserem etablierten Modell der EKZ mit dem tiefhypothermem Kreislaufstillstand (*siehe Abschnitt 6.1*). Um mögliche protektive Effekte der pharmakologischen Vorbehandlung deutlich für die quantitative Evaluation einer Reduktion der Schädigung im Gehirn zu untersuchen, wurden höhere Dosen für die Vorbehandlung ausgewählt. Da Cyclosporin nicht leicht die Blut-Hirnschranke penetrieren kann, wurde ebenfalls eine höhere

Dosierung von 60mg/kg ausgewählt. Ein anderer Aspekt, der für die Erhöhung der Dosis spricht, ist die Verdreifachung des zirkulierenden Blutvolumens auf 400-450 ml, nach Anschluss der kleinen Tiere mit einem Körpergewicht von 2-2,5 Kg an die EKZ .

Für FK506 wurde eine intravenöse Dosis von 0,2 mg/kg, für Cyclosporin 60mg/kg auf 20 ml NaCl 0,9% als Kurzinfusion langsam über eine Stunde von vier bis fünf Stunden vor Beginn der EKZ perfundiert.

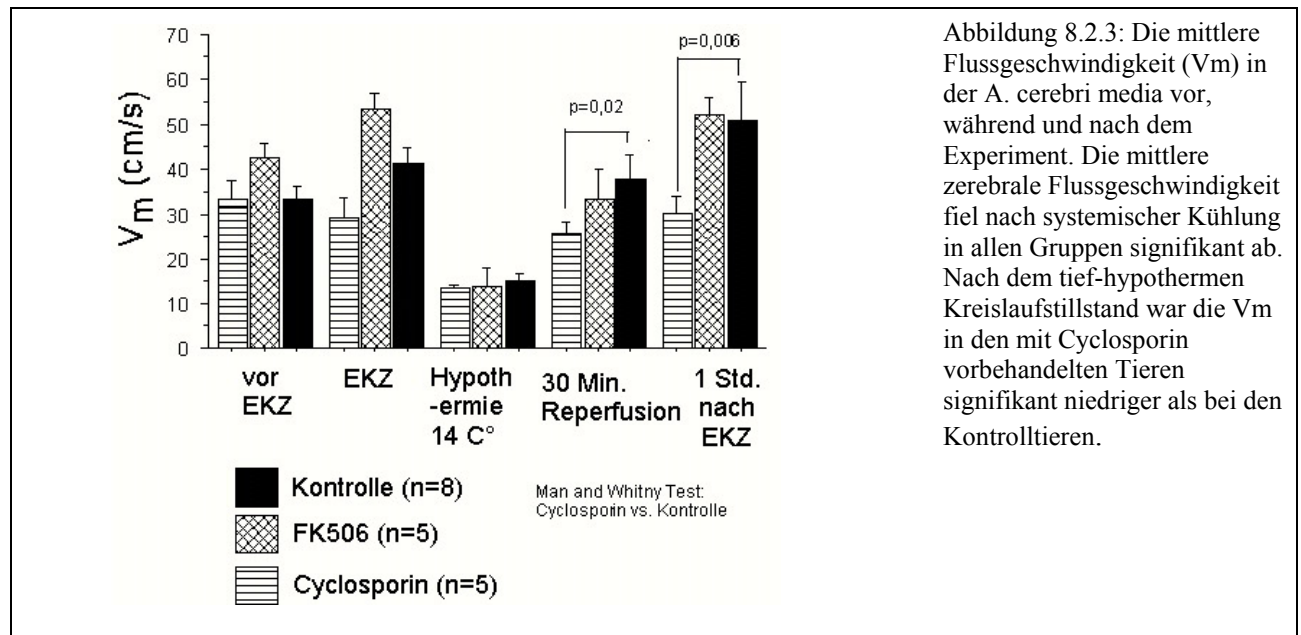
Die Tiere wurden standardisiert vorbereitet und dann nach einem einheitlichen Perfusionsprotokoll perfundiert (Abb. 6.1.2). Auch hier wurde beachtet, dass die Tiere eine Überwachungsphase nach dem Abgang von der EKZ von mindestens 5 Stunden ohne jegliche kardiopulmonalen Komplikation überlebten.

8.2.2. Ergebnisse

8.2.2.1. Zerebrale Perfusion

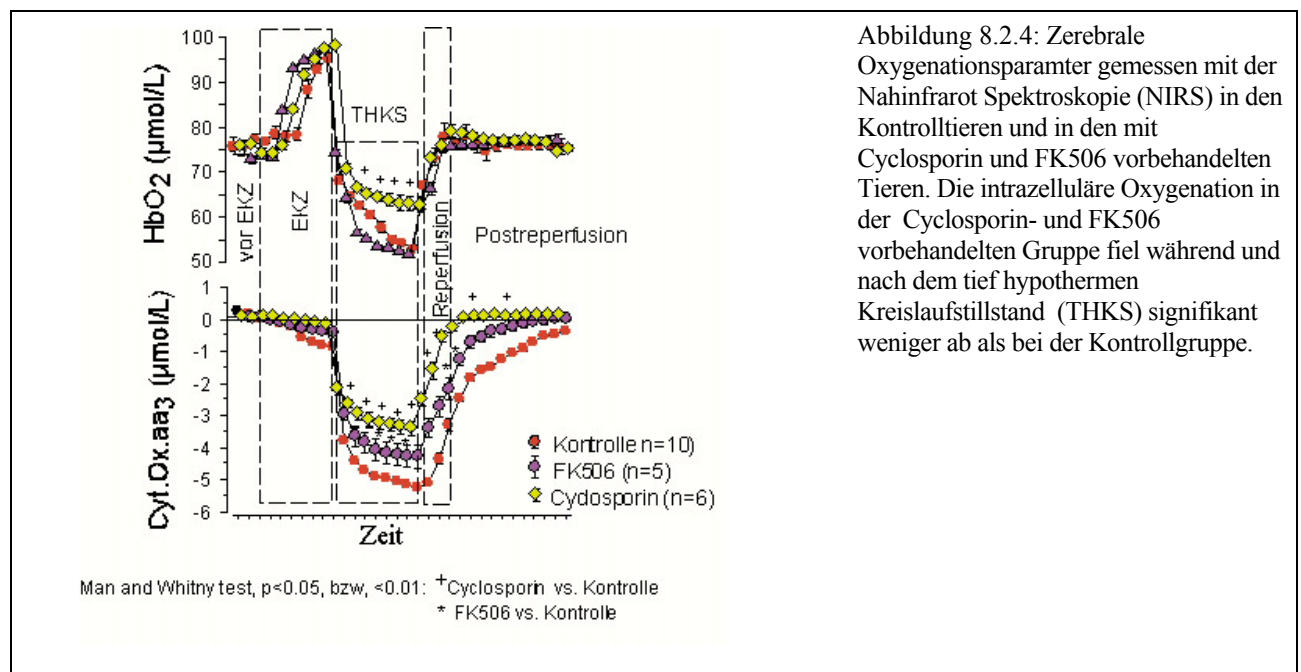
Die erhobenen Daten anhand serieller Messungen der mittleren Flussgeschwindigkeit (V_m) in der Arteria cerebri media zeigten jedoch einen repräsentativen Verlauf entsprechend der Veränderung in der regionalen und globalen zerebralen Perfusion (Abbildung 7.4.1).

Es zeigte sich eine verlangsamte zerebrale Flussgeschwindigkeiten in der Art. cerebri media in den mit Cyclosporin vorbehandelten Tieren. Die allmähliche Abnahme der mittleren Flussgeschwindigkeit in der Arteria cerebri media, trotz einer konstanten EKZ-Flussrate und eines Perfusionsdrucks während der systemischen Kühlung und Reperfusion nach dem tiefhypothermem Kreislaufstillstand, spiegelt möglicherweise einen vasokonstriktiven Effekt der Vorbehandlung mit Cyclosporins wider.



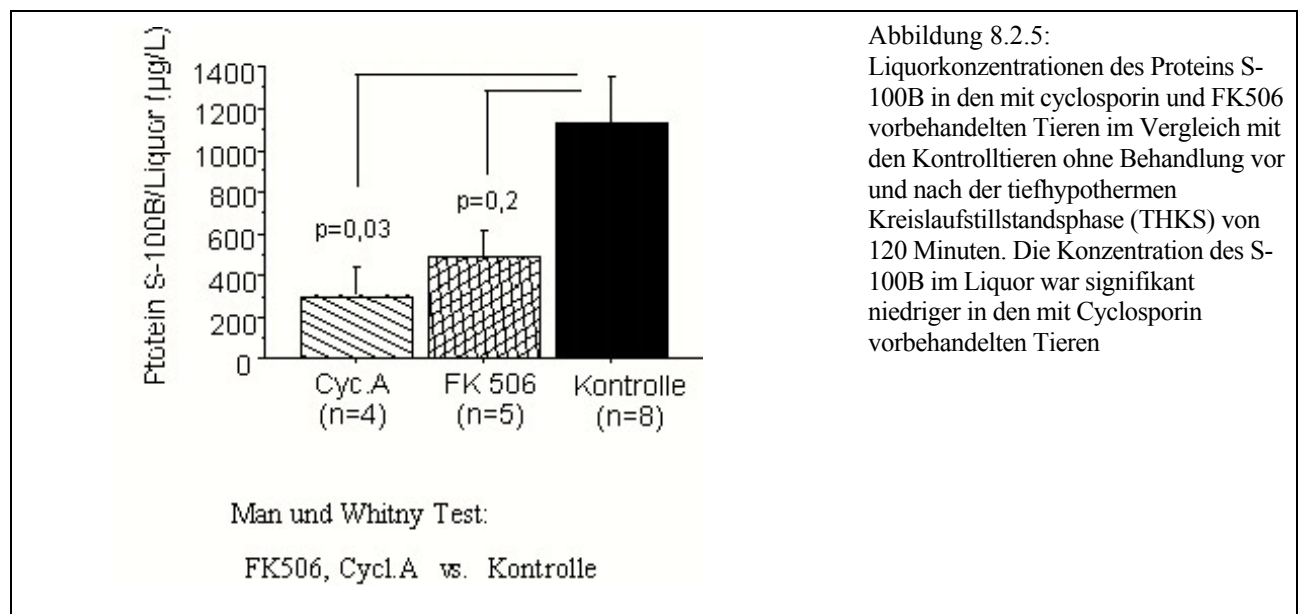
8.2.2.2. Zerebrale Oxygenation

Es fand sich in allen Gruppen ein ähnliches Änderungsmuster in den intravaskulären und intrazellulären Oxygenationsparametern entsprechend der Kühlung und Erwärmung sowie ein kontinuierlicher langsamer Abfall des intrazellulären Cyt.Ox aa₃ während des tiefhypothermen Kreislaufstillstandes (Abb. 8.2.4). Das Ausmaß der Reduktion des intrazellulären mitochondrialen Cyt.Ox.aa₃-Signals während des tiefhypothermen Kreislaufstillstandes war jedoch insbesondere bei den mit Cyclosporin und FK506 vorbehandelten Tieren signifikant weniger als bei den Kontrolltieren (Abb. 8.2.4).



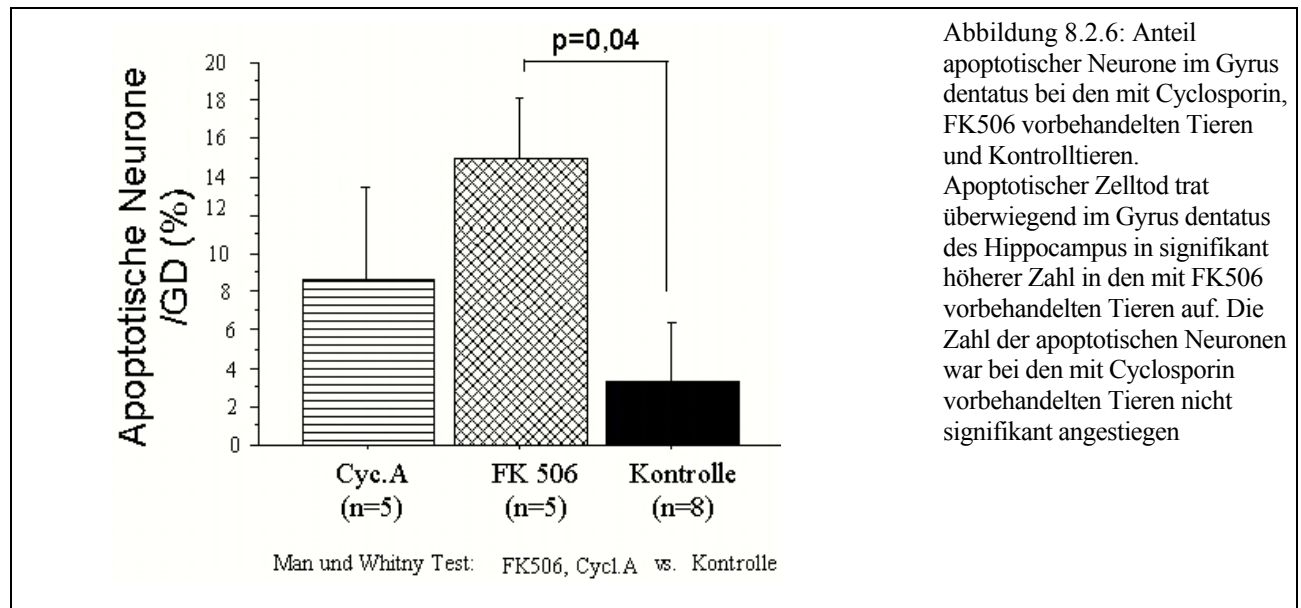
8.2.2.3. Biochemische Marker

Bei der Bestimmung der biochemischen Marker im Liquor fanden sich viele höhere Konzentrationen als im Serum. Die Marker im Liquor und nicht die im Serum, scheinen die Protektion und Verminderung der Schädigung durch die Vorbehandlung mit Cyclosporin und FK506 anzuzeigen. Die Konzentrationen des astrozytären Proteins S-100B waren niedriger in der FK506-Gruppe, erreichten jedoch nicht den statistisch signifikanten Unterschied im Vergleich mit der Kontrollgruppe (Abb. 8.2.5). Die Konzentration des S-100B war jedoch in der mit Cyclosporin vorbehandelten Gruppe signifikant niedriger ($p=0,02$).

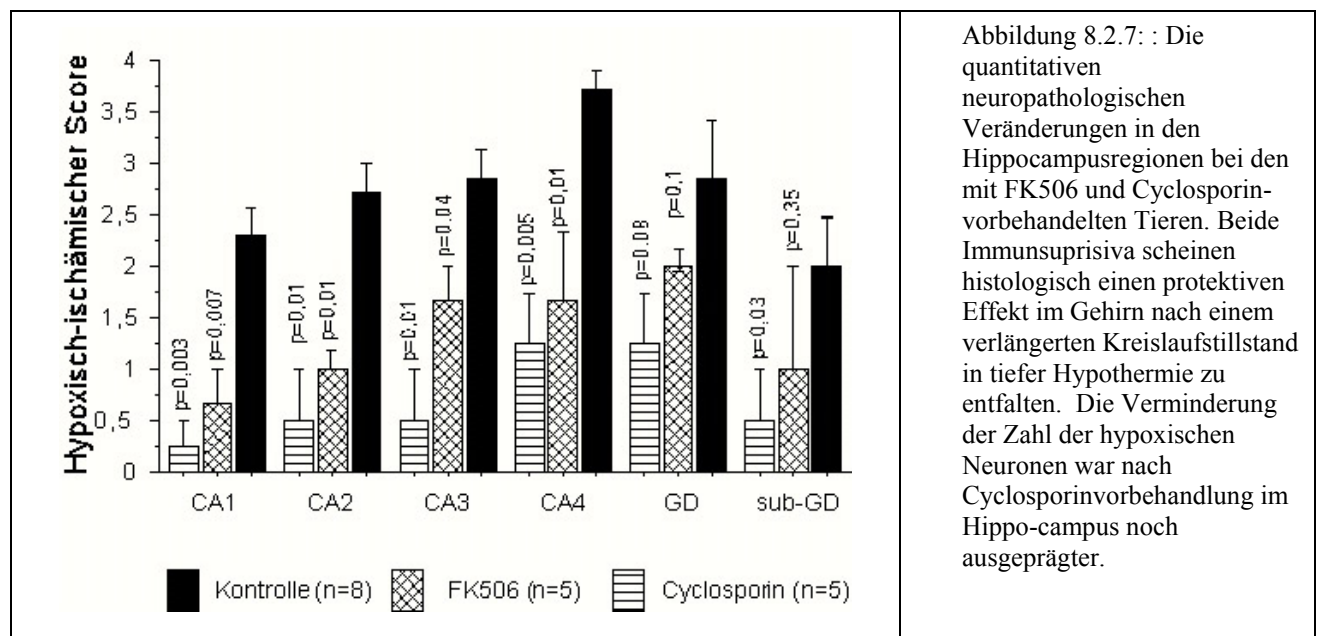


8.2.2.4. Auswertung des hypoxischen und apoptotischen neuronalen Zellverlusts

Die quantitative Auswertung der hypoxisch-nekrotischen neuronalen Zellschädigung und das Ausmaß der Verminderung dieser Schädigung durch die Vorbehandlung mit einer einmaligen Cyclosporin- und FK506-Dosis wurde in allen Regionen des Hippocampus sowie in dem frontalen Gyrus cinguli durchgeführt. Es zeigte sich eine Verminderung der hypoxischen Zellschädigung in allen Hippocampusregionen CA1 bis CA4 durch systemische Vorbehandlung mit einer einmaligen Gabe von Cyclosporin und FK506 (Abb. 8.2.6). Die Verminderung der hypoxischen Schädigung war noch höher bei den Tieren mit Cyclosporinvorbehandlung. Die Reduktion der hypoxischen Zellschädigung in dem Gyrus dentatus des Hippocampus war jedoch in beiden vorbehandelten Gruppen nicht signifikant (Abb. 8.2.6). Die Abnahme der ischämischen Schädigung im Gyrus cinguli des frontalen Hirns erreichte nur in der Cyclosporin-Gruppe eine statistisch signifikante Besserung (Abb. 8.26).



Apoptotische Neurone wurden in allen Regionen vereinzelt beobachtet. Für die Auswertung der Apoptose wurden sowohl HE- als auch TUNEL-gefärbte Schnitte benutzt. Die morphologischen Aspekte der Apoptose wie Chromatin-Kondensation wurden weiter in Semi-Dünnschnitten bestätigt. Apoptotische und TUNEL-positive Neurone wurden in großer Zahl überwiegend im Gyrus dentatus des Hippocampus gefunden. Die Anzahl apoptotisch-veränderter und TUNEL-positiver Neurone war in den beiden vorbehandelten Gruppen im Vergleich mit der Kontrollgruppe nicht signifikant vermindert (Abb. 8.2.7).



9. Diskussion

Die vorliegenden klinischen und tierexperimentellen Arbeiten lassen keinen Zweifel an einer physiologischen und morphologischen Störung auf zerebraler Ebene im Zusammenhang mit den angeborenen Herzfehlern und deren chirurgischer Behandlung mit Hilfe der extrakorporalen Zirkulation und dem tiefhypothermen Kreislaufstillstand. Die meisten dieser Kinder erreichen nach erfolgreichen Korrekturoperationen komplexer Vitien zunehmend das Erwachsenenalter und werden mit sozialen und beruflichen Herausforderungen konfrontiert^{3,8,115,273,274}. Viele Follow-up-Studien zeigen eine Störung in der psychomotorischen und kognitiven Leistung im Schulalter⁸. Die spätere soziale und gesellschaftliche Integration bei einem Teil der Kinder ist damit gestört.

Es stellt sich daher eine Notwendigkeit, primär nach den Pathomechanismen zu suchen, die zu diesen Störungen führen, und infolgedessen nach einer Optimierung aller Maßnahmen, die potenziell für das Gehirn und die spätere kognitive und psychomotorische Entwicklung während der chirurgischen Behandlung ein Risiko darstellen. Diese Arbeit setzte sich das Ziel, die Pathomechanismen der Hirnschädigung klinisch, mit Hilfe nicht-invasiver Monitoringsverfahren des Zentralnervensystems und tierexperimentell anhand einer umfassenden morphologischen Bearbeitung des Gehirns, zu untersuchen und entsprechend neuroprotektive Strategien zu entwickeln. Zu diesem Zweck wurde ein Tiermodell einer extrakorporalen Zirkulation am neugeborenen Schwein entwickelt, um diese Fragestellungen zu bearbeiten.

Der tiefhypotherme Kreislaufstillstand wird sicherlich überwiegend nur bei den Korrekturoperationen komplexer Vitien im neonatalen Alter eingesetzt, stellt aber das höchste Risiko für die Entwicklung neurologischer Affektionen während und nach dieser Prozedur dar. Wir haben diese verlängerte Phase des Kreislaufstillstandes ausgewählt, um signifikante morphologische Veränderungen unter diesen Bedingungen der nicht-pulsatilen hypothermen Perfusion sichtbar zu machen und den Effekt neuroprotektiver Interventionen quantitativ zu evaluieren.

9.1. Erfassung der Hirnschädigung im Zusammenhang mit angeborenen Herzfehlern

Die häufigsten sonographisch feststellbaren Läsionen nach tief hypothermer Perfusion mit der EKZ wurden bei Neugeborenen nach Korrekturoperation der d-Transposition der großen Arterien in Form intraventrikulärer Blutungen gefunden. Das Auftreten solcher Läsionen bei Reifneugeborenen, die eher für Frühgeborene typisch sind, ist möglicherweise durch hypoxisch-

ischämische Ereignisse im vulnerablen Gefäßbett des Plexus choroideus während hypothermer Perfusion zu erklären. Ähnliche abnorme sonographische Befunde wie intraventrikuläre Blutungen oder Erweiterung der Liquorräume wurden bei Neugeborenen nach herzchirurgischen Eingriffen oder kardiorespiratorischer Unterstützung mit ECMO beobachtet^{29,106,107}. Die häufige Lokalität der Blutung im Plexus choroideus mit einem großen Netz von kleinen Kapillaren könnte die Vulnerabilität dieses Gefäßbetts auch bei Reifneugeborenen für hypotherme nicht-pulsatile Perfusion der EKZ erklären²⁷⁵. Viele tierexperimentelle Arbeiten zeigten die funktionelle und strukturelle Empfindlichkeit dieser zerebrovaskulären Region für hypoxische und hypotensive Phasen^{275,276}.

Parenchymatöse Blutungen wurden klinisch bei Neugeborenen mit prä- und postnatal verkannten zyanotischen Vitien beobachtet^{104,109}. Das pränatale Verkennen solcher Malformationen des Herzens, die sich auch häufig erst nach Tagen klinisch durch Zyanose oder Schockzustände manifestieren, zeigt weiterhin eine mangelhafte Kapazität in der pränatalen Diagnostik angeborener Vitien. Eine prospektive kontrollierte Studie der Yale Universität in New Haven zeigt signifikant weniger hypoxisch-azidotische Zustände bei Neugeborenen mit bereits pränatal diagnostizierten angeborenen Vitien^{104,109,277}. Das Auftreten solcher fatalen zerebralen Komplikationen unterstreicht damit die Notwendigkeit eines pränatalen Screenings insbesondere ductusabhängiger Vitien, um die Protektion des Gehirns gegen solche hypoxischen Ereignisse frühzeitig zu sichern.

Unsere Follow-up-Untersuchung der kognitiven und psychomotorischen Leistungen in einer homogenen Gruppe von Schulkindern nach Korrekturoperationen einer Fallot'schen Tetralogie zeigte nur in bestimmten Leistungen einen signifikanten Unterschied im Vergleich mit einer Kontrollgruppe aus gleichaltrigen Kindern nach interventionellem Verschluss eines Vorhofseptumdefektes. Bei den Fallot-Kindern waren perioperativ keine klinisch erfassbaren neurologischen Komplikationen aufgetreten. Obwohl die kognitiven und psychomotorischen Leistungen bei den Fallot-Kindern sich noch im Normbereich für Schulkinder aus unterschiedlichen sozialen Schichten befanden, zeigten sie signifikant niedrigere Werte in den Domänen der Wahrnehmung und Handlungsfähigkeiten im Vergleich mit der Kontrollgruppe (Abb. 2.4.2). Weder der Gesamt-IQ noch die anderen Leistungen in den Untertests korrelierten signifikant mit der Zahl der Operationen, Dauer der EKZ oder dem Alter bei der Operationen. Insgesamt zeigte sich somit eher ein günstiges Ergebnis der kognitiven Entwicklung bei diesen Kindern. Nach den vorliegenden Ergebnissen sind signifikante neurologische Schädigungen bei unkomplizierten hämodynamischen Verläufen bei den eingesetzten Perfusionsmethoden mit begrenztem Kreislaufstillstand in tiefer Hypothermie nicht zu erwarten. In tierexperimentellen Arbeiten waren sowohl neurophysiologisch

als auch morphologisch keine signifikanten Veränderungen unter ähnlichen EKZ Bedingungen feststellbar. Tom Karl et. al. aus Melbourne berichtete auf der Tagung der amerikanischen Gesellschaft für Thoraxchirurgie 2001 über ähnliche Ergebnisse einer milden Störung der psychomotorischen und kognitiven Entwicklung bei einer homogenen Gruppe von Kindern nach Switch-Operationen, die mit höherer Flussrate der EKZ ohne Kreislaufstillstand operiert wurden²⁷⁸. Obwohl möglicherweise latente zerebrale Schädigungen bei dem Anschluss an der EKZ stattfinden, bleibt die genaue Ursache gewisser Defizite in den kognitiven und psychomotorischen Leistungen ungeklärt. Diese Tatsache legt den Verdacht nah, dass andere Faktoren zu den verminderten kognitiven und psychomotorischen Leistungen nach der Korrekturoperation im Langzeitverlauf beitragen^{8,34,273}. Viele Autoren haben zusätzliche angeborene Läsionen oder Malformationen im Zentralnervensystem spekuliert^{8,34}. Eine retrospektive Analyse des Gehirns verstorbener Kinder mit angeborenen Herzfehlern mit und ohne Operationen hat sich daher diese Fragestellung gewidmet.

Die neuropathologische Analyse des Gehirns von verstorbenen Neugeborenen und Kindern mit angeborenen Herzfehlern nach Korrekturoperationen mit Hilfe der EKZ zeigte das Vorkommen von sichtbaren erworbenen Läsionen, wie subarachnoidale und intraventrikuläre Blutungen vor allem bei den Neugeborenen mit d-TGA nach Switch-Operationen. Diese Befunde stimmen mit den klinisch-sonographischen Befunden überein, bei denen die intraventrikulären Blutungen als die häufigsten sichtbaren intrazerebralen Komplikationen bei Neugeborenen zu beobachten sind^{106,107,276}. Die in den Autopsien gefundenen subarachnoidalen Blutungen waren kaum klinisch oder sonographisch feststellbar. Diese perioperativ erworbenen Läsionen sind nicht aufgrund ihrer Lage mit Hilfe des routinemäßig durchgeführten Schädelultraschalls erfassbar. Dagegen waren solche peripher gelegenen Läsionen mit dem dreidimensionalen Ultraschall zu diagnostizieren^{104,105,109}. Die Methode ist jedoch zur seriellen Kontrolle auf der Intensivstation praktisch nicht einsetzbar.

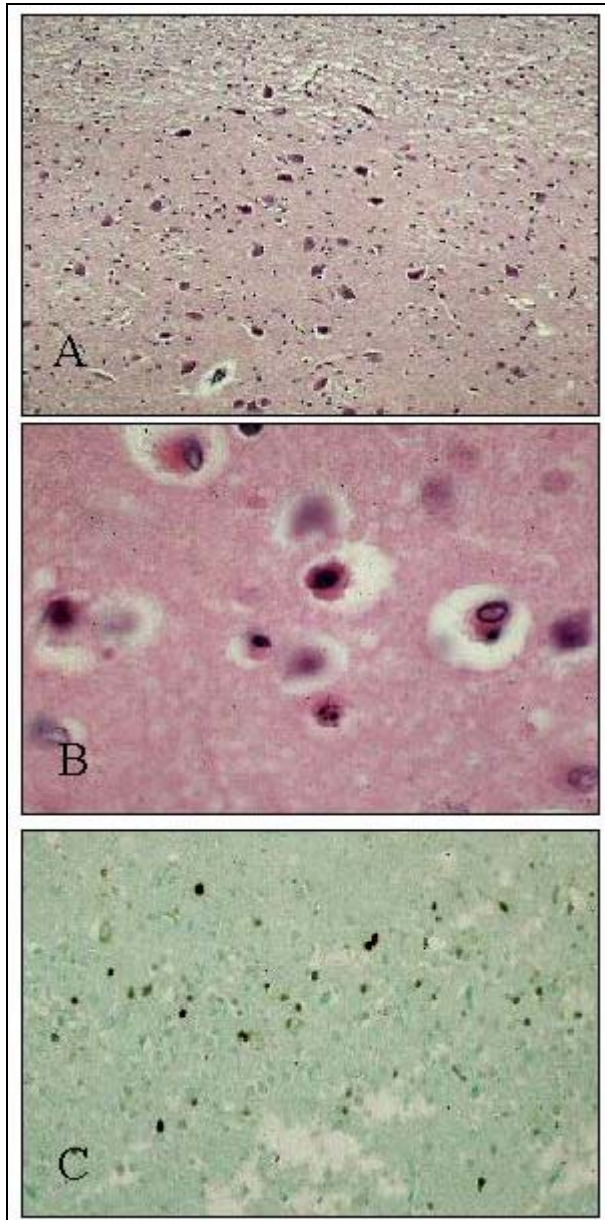


Abbildung 9.1.1: 2 Modus der neuronalen Zellschädigung in Autopsien von Kindern nach Herzoperationen mit der extrakorporalen Zirkulation. A. Hypoxisch geschädigte Neurone im Thalamus HE x10, B. Subikuläre Apoptose und perineurales Ödem HE 20x, C. Apoptose im Subiculum TUNEL x10,

Mikroskopisch wurde neben der Zellschädigung durch Nekrose das Vorkommen von neuronalen Apoptosen oder TUNEL-positiven Neuronen in den Hippocampusregionen beobachtet³³. Diese Befunde bestätigen die Rolle der Apoptose beim neuronalen Zellverlust nach komplizierten herzchirurgischen Eingriffen bei Kindern mit angeborenen Herzfehlern^{13,30,47,233}. Die auslösende Ursache für die Apoptose im Zentralnervensystem bei diesen Kindern ist unklar. Sowohl intraoperative als auch postoperative Faktoren können eine Rolle spielen^{27,47}. Multiple kardiale und sedierende Medikamente werden für längere Zeit bei diesen kritisch kranken Neugeborenen während der postoperativen Phase eingesetzt. Die Wirkung und Wechselwirkung im Zentralnervensystem während und nach solchen nicht-physiologischen Zuständen ist unklar. Neue Ergebnisse in tierexperimentellen Arbeiten zeigen eine neuronale Apoptoseinduktion im Gehirn bei Neugeborenen nach Gabe von Ketamin, Phenobarbital unter physiologischen Zuständen^{279,280}.

Unsere Ergebnisse im tierexperimentellen Teil bestätigten die Rolle einiger Medikamente bei der Induktion von Apoptose im Hippocampusbereich (siehe 8.1, 8.2).

Zusätzlich zu diesen erworbenen Läsionen, die wahrscheinlich im Rahmen hämodynamischer Komplikationen während oder nach der Operation auftreten ²⁸¹, wurden auch andere kongenital assoziierte Läsionen im Zentralnervensystem festgestellt ^{32,34}. In vielen Follow-up-Studien zur Untersuchung der psychomotorischen und kognitiven Leistung dieser Kinder wurden, neben der Rolle der chirurgischen Maßnahmen mit Hilfe der EKZ, kongenitale Läsionen bzw. Malformationen im Zentralnervensystem als mitverantwortliche Faktoren für die verminderte Entwicklung bei diesen Kindern vermutet ^{3,8,13,29,30,32}. Diese Vermutung einer assoziierten angeborenen Malformation im Zentralnervensystem wurde teilweise in Autopsieberichten in der Literatur bestätigt ^{32,34,110,111}. Die Tatsache, dass die Hirngewichte verstorbener Neugeborener mit hypoplastischem Linksherzsyndrom und d-Transposition der großen Arterien signifikant kleiner sind als die Gleichaltriger, unabhängig von dem Anschluss an der EKZ, weist auf eine bereits intrauterin ausgebildete assoziierte Malformation des Gehirns hin ³³. Einer der häufigsten zerebralen Befunde bei Kindern mit zyanotischen Vitien ist das gehäufte Vorkommen von Hydrocephalus evacuo, welcher unabhängig von peri- oder postoperativen ischämischen Ereignissen bei Kindern mit zyanotischen Vitien zu beobachten ist ^{29,32}. In einer prospektiven Untersuchung der neurologischen Entwicklung im ersten Lebensjahr konnten wir einen signifikant kleineren Kopfumfang unterhalb der 3er Perzentile bei Kindern mit komplexen Vitien nach den ersten palliativen Maßnahmen unabhängig vom Anschluss an die EKZ feststellen ²⁸². Miller G et al 1999 spekulierte, dass eine fortschreitende Microcephalie und das verzögerte Wachstum des Gehirns für die abnorme neurologische und psychomotorische Entwicklung verantwortlich sind ^{29,32}.

Daher wurde die Erfassung des Kopfumfangs in der kardiologischen Kontrolluntersuchung eingeschlossen. Eine prospektive Untersuchung zur Erfassung des Kopfumfangs bei allen Neugeborenen und Kindern vor und nach Herzoperationen wurde in unserer Klinik eingeleitet. Zusätzlich sollte in einer Follow-up Untersuchung die neurologische und psychomotorische Signifikanz dieser Beobachtung evaluiert werden.

9.2. Überwachung der zerebralen Perfusion während und nach der Korrekturoperationen angeborener Herzfehler

Wir konnten anhand der Registrierung der zerebralen Oxygenation und Perfusion zeigen, dass eine signifikante Veränderung dieser Parameter während und nach der Operation stattfindet. Obwohl diese Überwachungsmethoden eine Aussage über das Verhalten der Perfusion und den Sauerstoffmetabolismus nur in einem begrenzten Hirnareal liefern, zeigen die vorliegenden klinischen und experimentellen Ergebnisse eine gute Validität dieser Methoden zur Überwachung von Alterationen in der globalen zerebralen Perfusion und Oxygenation während der EKZ^{119,123,131,234,283,284}. Die Überwachung der intravaskulären Oxygenationsparameter liefert möglicherweise eher Informationen zur zerebralen Hämodynamik als über signifikante Veränderungen im Sauerstoffmetabolismus auf zellulärer Ebene^{124,138,176,185,207,234}.

Während der nicht-pulsatilen EKZ kann nur die mittlere Flussgeschwindigkeit zur qualitativen Beurteilung von Veränderungen in der zerebralen Perfusion herangezogen werden. Der Pulsatilitätsindex ist nur vor und nach der EKZ zur Beurteilung des Verhältnisses der systolischen zu der diastolischen Geschwindigkeit geeignet. Die transkranielle Dopplersonographie ist eine einfache nicht-invasive Methode zur kontinuierlichen Registrierung des zerebralen Flussmusters während abnormer Schwankungen der physiologischen Parameter während der EKZ wie Druck, pH und Temperatur. Sowohl klinisch als auch tierexperimentell konnte die kontinuierliche Registrierung des zerebralen Flussmusters Informationen über das Verhalten der zerebralen Perfusion während der Kühlung und Erwärmung an der EKZ aufzeigen^{119,126,130,131}. Der kontinuierliche Abfall der zerebralen Flussgeschwindigkeit in der Arteria cerebri media während hypothermer Perfusion, trotz unveränderter Flussrate der EKZ, weist auf signifikante Unterdrückung des Gewebemetabolismus unter hypothermen Temperaturen hin^{131,207,240}. Dieses Phänomen konnte tierexperimentell mittels Evaluierung der regionalen Gewebepfusion mit Mikrosphären bestätigt werden. Es zeigte sich auch eine Korrelation zwischen der Messung der zerebralen Flussgeschwindigkeiten in der Arteria cerebri media und der globalen Hirnperfusion. Die direkte Registrierung des zerebralen Flussmusters erwies sich auch als sehr hilfreich bei der Überwachung der zerebralen Perfusion während kritischer Phasen der EKZ, wie die aortale Kannülierung und die genauere Platzierung der Aortenkanüle vor den Halsgefäßen ohne Beeinträchtigung der zerebralen Perfusion. Eine enge Korrelation zwischen der systemischen Kühlung und dem graduellen Abfall der mittleren Flussgeschwindigkeit in der Arteria cerebri media wurde sowohl klinisch als auch tierexperimentell festgestellt. Die kontinuierliche Überwachung des

zerebralen Flussmusters spiegelt somit indirekt die zerebrale zelluläre- und/oder vaskuläre Reaktion auf Hypothermie wieder.

Unmittelbar nach dem Ende der EKZ und dem Etablieren einer suffizienten kardial-bedingten zerebralen Perfusion war der Pulsatilitätsindex bei den Neugeborenen nach hypothermer Perfusion noch erhöht. Eine funktionelle Störung der Vasoaktivität in verschiedenen Organen und möglicherweise auf zerebraler Ebene wird nach EKZ vermutet^{27,131}. Morphologische Untersuchungen des Gehirns zeigen diffuse Veränderungen in allen Regionen in Form von Schwellung der Astrozyten im perivaskulären Bereich^{285,286}. Dieses morphologische Muster wurde auch in unseren experimentellen Untersuchungen, unabhängig von der Ischämiezeit, gefunden^{43,206}. Ausgeprägte Veränderungen in Form eines retrograden diastolischen Flussmusters wurden nur in einzelnen Fällen bei Kindern nach hypothermem Kreislaufstillstand beobachtet. Erstaunlicherweise wurde dieses Phänomen bei den neonatalen Schweinen sogar nach verlängertem Kreislaufstillstand von zwei Stunden nicht beobachtet. Nach unserem Protokoll wurden die Tiere vor dem Beginn der Erwärmung initial für 10 Minuten mit kaltem Perfusat in niedrigeren Flussraten re-perfundiert. Klinische Beobachtungen haben bereits ein antegraden diastolischen Flussmuster festgestellt, wenn die Reperfusion nach dem Kreislaufstillstand mit hypothermer Perfusion startet^{117,287}.

Auch nach Ende der Operation wurden die zerebralen Flussgeschwindigkeiten in den basalen zerebralen Gefäßen untersucht²⁷⁶. Die wesentlichen Veränderungen im postoperativem Flussmuster fanden sich während der ersten 24 Stunden nach EKZ-Ende. Die zerebralen Flussgeschwindigkeiten waren im Vergleich mit den präoperativen Werten während der ersten acht Stunden signifikant erniedrigt²⁷⁶. In dieser Phase zeigte sich eine Abhängigkeit der Veränderung in den zerebralen Flussgeschwindigkeiten vom Alter, Gewicht, Bypasszeit und der minimalen Temperatur während der EKZ. Inwieweit diese Veränderung im postoperativen zerebralen Flussmuster von signifikant neurologischer Bedeutung ist, bleibt unklar. Bei einer Gruppe von Neugeborenen mit sonographisch feststellbaren intraventrikulären Blutungen waren die begleitenden enddiastolischen Geschwindigkeiten in dieser Phase signifikant höher als bei Kindern ohne Blutung^{132,276}. Diese Veränderung bei den Neugeborenen mit intraventrikulären Hämorrhagien könnte als ein vasodilatatives Reaktionsmuster auf ein ischämisches Ereignis interpretiert werden. Ähnliche Beobachtungen wurden bei Dopplerstudien bei Neugeborenen nach perinataler Asphyxie beobachtet²⁸⁸.

9.3. Überwachung der zerebralen Oxygenation während und nach Korrekturoperationen angeborener Herzfehler

9.3.1. Veränderung der regionalen Hämoglobinsättigung (rSO₂) während der Operation

Die Alterationen der zerebralen Sauerstoffoxygenierung könnte eine auslösende Ursache für unterschiedliche Formen der zerebralen Zellschädigung während und nach der EKZ sein ^{124,138,145,237,283}. Das Absinken der regionalen zerebralen Hämoglobinsättigung, die in engem Zusammenhang mit der venösen Blutsättigung im Bulbus jugularis steht, könnte möglicherweise auf eine Alteration der globalen zerebralen Sauerstoffsättigung während der Reperfusionsphase und am Ende der EKZ hinweisen ^{139,207,289,290}.

Während der extrakorporalen Zirkulation könnten multiple physiologische Faktoren zu den Veränderungen in der regionalen zerebralen Hämoglobinsättigung wie Temperatur, Hämodilution und Perfusionsdruck beitragen (Abb. 5.1) ^{120,138,234}. Unmittelbar nach Anschluss an die Herzlungenmaschine ist die Angleichung der zerebralen Sättigungswerte in allen Gruppen durch die Versorgung des Gehirns mit vollgesättigtem Blut zu erklären. Der nachfolgende unterschiedliche Abfall der regionalen zerebralen Hämoglobinsättigung trotz konstanter Flussraten deutet jedoch auf einen anhaltenden Sauerstoffverbrauch und ein Missverhältnis zwischen Angebot und Bedarf des Hirngewebes auch in moderater und tiefer Hypothermie hin. Andere Faktoren wie der präoperative Ausgangswert der arteriellen Blutsättigung der Hämatokritwert, der Perfusionsdruck und der Säure-Basen-Haushalt können in unterschiedlichem Maße zu den Veränderungen der regionalen zerebralen Hämoglobinsättigung beitragen ^{65,122,138,145}.

Weiterhin kam es zu unterschiedlichen Veränderungen der regionalen zerebralen Hämoglobinsättigung während der Erwärmung und nach Ende der extrakorporalen Zirkulation. Ein vermehrter Sauerstoffverbrauch wurde nach hypothermer Perfusion bei herzchirurgischen Eingriffen in klinischen und tierexperimentellen Studien beobachtet ^{120,138,145}. Zusätzlich zur erhöhten Ausschöpfung im Gehirn ist das Sauerstoffangebot durch einen gestörten kardialen Auswurf in dieser Phase vermindert. Alterationen der zerebralen Oxygenation und Perfusion könnten somit für die neuronale Zellschädigung in dieser Phase teilweise verantwortlich sein ^{120,145,283}. Nollert et al. fanden eine signifikante Verminderung der neuronalen Schädigung durch eine hyperoxygenierte Reperfusion im Gegensatz zur normal oxygenierten Reperfusion nach tief hypothermem Kreislaufstillstand in einem tierexperimentellen Schweinemodell ^{122,186}.

Die Limitierung der neurologischen Aussage solcher intra- und unmittelbar postoperativen Beobachtungen in der Kinderherzchirurgie besteht darin, daß neurologische

Langzeituntersuchungen unter Einbeziehung dieser neurophysiologischen Monitoring-Methoden fehlen²⁹¹.

9.3.2. Veränderung der regionalen Hämoglobinsättigung (rSO₂) während der postoperativen Phase

Die kontinuierliche transkranielle Messung der regionalen Hämoglobinsättigung (rSO₂) spiegelt die Veränderung in der gemischt-venösen intrakraniellen Blutsättigung wider (Abb. 9.3.1)^{138,185,207,289,292}. Die signifikant erniedrigten rSO₂-Werte in der frühen postoperativen Phase könnten auf eine erhöhte zelluläre Utilisation von Sauerstoff durch die Hirnzellen und/oder ein vermindertes Angebot an Sauerstoff durch niedriges Herzzeitvolumen hinweisen^{121,125}. Diese Veränderungen waren bei Neugeborenen mit einer insgesamt instabileren Hämodynamik und längeren Operationszeiten bei komplexeren Vitien noch ausgeprägter (Abb. 9.3.1)²⁹³.



Abbildung 9.3.1: . Bettnahes nicht-invasives Neuromonitoring der zerebralen Oxygenation mit Hilfe der nahinfrarot Spektroskopie und perfusion mit Hilfe der transkraniellen Dopplersonographie, bei einem Kind nach einer Herzoperation auf der Intensivstation

Die signifikante positive Korrelation zwischen der niedrigeren frühpostoperativen rSO₂ und der zentralvenösen Sättigung weist auf eine hämodynamisch bedingte Erklärung dieser Beobachtung hin²⁹³. Eine Optimierung und Anpassung der Ventilation und der Hämodynamik sowie Optimierung des Sauerstoffangebots und Herzzeitvolumens während dieser vulnerablen Phase ist daher notwendig, um eine optimale zerebrale Oxygenation zu erreichen. Die Veränderung in der rSO₂ in diesem Bereich scheint eher hämodynamisch bedingt und möglicherweise nicht notwendigerweise mit einer signifikanten Alteration der Verfügbarkeit von Sauerstoff auf intrazellulärer Ebene assoziiert zu sein^{138,140-142}. Signifikante Veränderung des pO₂, des mittleren arteriellen Druckes oder des Hämoglobingehaltes im Blut waren während der Erhebung der zerebralen Hämoglobinsättigung auf der Intensivstation nicht aufgetreten. Daher bietet die kontinuierliche Registrierung der rSO₂ mit dem INVOS-Zerebraloxymer mehr eine Überwachung

von Veränderungen der regionalen intravaskulären Hämoglobinsättigung und weniger eine direkte Erfassung von Veränderungen des Sauerstoffmetabolismus auf zellulärer Ebene.

9.3.3. Veränderung der intrazellulären Oxygenation

Sowohl klinisch als auch tierexperimentell zeigten sich große Schwankungen des oxygenierten und deoxygenierten Hämoglobins als Ausdruck von Veränderungen in Perfusionsdruck, Flussraten, Sauerstoffgehalt oder Temperatur^{207,289,292}. Ein signifikanter Abfall des Cyt.Ox aa₃-Signals war nur bei Stillstand der Zirkulation oder während einer signifikanten Hämodilution oder bei Druckabfall zu beobachten^{138,207,289,292}. Die Abnahme des Cyt.Ox.aa₃, als Indikator für Veränderungen im Sauerstoffmetabolismus auf intrazellulärer bzw. mitochondrialer Ebene tritt möglicherweise nur auf, wenn der Sauerstofftransport aus den Kapillaren ins Gewebe signifikant deprimiert ist^{140,143}. Daher eignet sich die kontinuierliche Registrierung des Cyt.Ox aa₃Signals besonders für die Überwachung der intrazellulären Oxygenation während extremer Phasen der EKZ wie Hämodilution, tiefer Kühlung oder des Kreislaufstillstands in tiefer Hypothermie^{237,283}. In tierexperimentellen Studien korrelierte der Abfall des Cyt.Ox aa₃ während des tief hypothermen Kreislaufstillstandes mit der Reduktion des intrazellulären Energieträgers ATP und ermöglichte die Vorhersage über das Ausmaß der neuronalen Zellschädigung^{145,283,294,295}. Inwieweit die Veränderungen im Cyt.Ox aa₃ während der EKZ ohne Kreislaufstillstand in tiefer Hypothermie eine diagnostische oder prognostische Bedeutung haben, ist bis jetzt unklar.

Die trankranielle Quantifizierung des Oxydations- und Redoxzustandes der Cyt.Ox aa₃ ist auch mit Limitationen behaftet^{283,296,297}. Die genaue Eindringtiefe des Lichtes im Hirnparenchym mit dieser Wellenlänge ist nicht gänzlich bekannt^{152,298}. Extrazerebrale Faktoren wie Liquor, die Gyrierung der kortikalen Schicht und ein mögliches Ödem nach der EKZ könnten die Penetration, die Streuung und das Absorbieren des Lichtes im Gewebe beeinflussen²⁹⁶. Auf der anderen Seite wurde die Zuverlässigkeit der NIRS-Messung zur Erfassung des Zustandes der mitochondrialen Oxygenation durch selektive Blockierung der Cytochromoxydase mit Zyanid unter Beibehaltung der intravaskulären Hämoglobinsättigung in experimentellen Arbeiten bestätigt¹⁴¹. Der Zusammenhang zwischen dem Abfall des intrazellulären NIRS-Signal Cyt.Ox aa₃ und der Reduktion der Energieträger ATP während der zerebralen Ischämie wurde in mehreren tierexperimentellen Untersuchungen demonstriert^{147,283,294,295,299,300}.

9.4. Wertigkeit der Bestimmung zerebraler Marker im Serum zur Diagnose von Hirnaffektionen nach herzchirurgischen Eingriffen

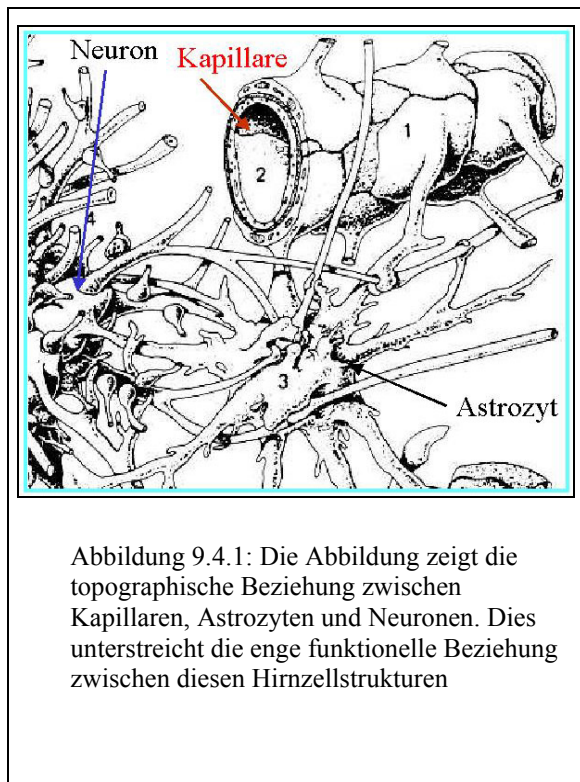
9.4.1. Normale und pathologische Serumwerte des Proteins S-100B bei Kindern nach herzchirurgischen Eingriffen:

Die Bestimmung der Serumwerte des astroglialen Proteins S-100B vor und nach der EKZ zeigte einen signifikanten abrupten Anstieg, welcher im Zusammenhang mit dem unmittelbaren Anschluss an die EKZ steht^{42,43,176,301,302}. Die postoperativen maximalen Werte waren von Alter, Gewicht und Dauer der EKZ abhängig^{42,43,176,301,302}. Neurologische Affektionen waren nach herzchirurgischen Eingriffen mit abnorm hohen Serumwerten im Serum assoziiert^{42,176,301,303}. Daher war es wichtig, erstmals anhand einer großer Zahl von Kindern "normale" und abnormale Serumwerte nach Korrekturoperationen definierter Gruppen angeborener Herzfehler zu beschreiben¹⁷⁷.

Die Funktion einer erhöhten Synthese und /oder Freisetzung des Ca^{++} -bindenden Proteins S-100B aus den Astrozyten unter dem Einfluss der extrakorporalen Zirkulation ist unklar. Die Ca^{++} -Hömoostase spielt nach einer Ischämie und Reperfusion eine wesentliche Rolle bei dem neuronalen Zelltod^{212,304}. Protektive und trophische Funktionen wurden der erhöhten Expression des Ca^{++} -bindenden Proteins S-100B nach neuronaler Schädigung zugeschrieben¹⁵⁴. Daher ist eine protektive oder trophische Rolle des S-100B in Zusammenhang mit hypothermer Perfusion der EKZ nicht auszuschließen³⁰⁵⁻³⁰⁷. Tierexperimentell wurde immunhistochemisch eine diffuse Ausbreitung des S-100B-Färbung im gesamten Hirnareal nach EKZ und tief hypothermem Kreislaufstillstand beobachtet^{43,206}. Insbesondere wurde die Immunfärbung des S-100B in perivaskulären ödematösen Prozessen der Astrozyten vermehrt gefunden^{43,206}.

Die Astrozyten grenzen mit ihren Fortsätzen unmittelbar an die Endothelzellen der Kapillaren (Abb. 9.2). Bei Hypoxie werden diese Fortsätze beschädigt. Der gleichzeitige Anstieg des Lipidperoxidationsendproduktes MDA und des Astroglialzell-markers in der Reperusionsphase während der EKZ weist möglicherweise auf eine O₂-Radikalinduzierte Zellmembranschädigung in diesen Fortsätzen auf zerebraler Ebene hin⁴². Da das Protein S-100B ein astrozytäres und nicht-neuronales Zellprotein ist, erscheint eine früh-postoperative Aussage über das Ausmaß einer neuronalen Schädigung anhand des transienten Anstiegs des astroglialen Proteins S-100B im Serum nicht sicher möglich^{176,177,197}. Eine frühe morphologische Manifestation einer Ischämie-Reperfusion-Zellschädigung ließ sich in den Astrozyten und nicht in den Neuronen feststellen^{43,308,309}. Eine primäre Schädigung der Astrogliazellen, die ca. 50-60% der Hirnmasse ausmachen und eine vitale Rolle im

Transmittermetabolismus und im nutritiven Transport des Zentralnervensystems spielen, scheint jedoch für eine spätere sekundäre Schädigung der Neuronen von Bedeutung zu sein (Abb. 9.4.1)³⁰⁸.



Das Protein S-100B kommt global in allen Hirnarealen in den Astrogliazellen vor und ist nicht auf eine regionale Zellpopulation begrenzt. Dies unterstreicht den diagnostischen Wert eines signifikanten Anstieges des astrozytären Proteins S-100B als Frühmarker für globale Ischämie in den Astrogliazellen und als prognostischen Marker für mögliche sekundäre Zellschädigungen der Neuronen. Ein persistierender abnormer Anstieg des S-100B im Serum für weitere 24 Stunden nach der EKZ ist möglicherweise auch hinweisend auf eine neuronale Zellschädigung und somit von frühdiagnostischer Bedeutung^{43,301}. Dies wurde bei Kindern mit manifesten neurologischen Abnormalitäten, wie

postoperativen generalisierten Krämpfen, oder nachweisbaren Hirnparanchymläsionen beobachtet^{177,301,303,310}.

Die neurologische Signifikanz des passageren Anstieges um zwei Standardabweichungen des Ausgangswertes ist unklar. Viele Follow-up-Untersuchungen bei Erwachsenen nach herzchirurgischen Eingriffen zeigten einen prädiktiven Wert des S-100B im Serum hinsichtlich abnormer psychologischer Befunde^{181,311}. Im Gegensatz zeigten Nachuntersuchungen der psychomotorischen und neurologischen Entwicklung bei Kindern ohne feststellbare postoperative zerebrale Affektionen keine signifikanten Korrelationen zwischen dem erhöhten postoperativen Wert und der psychomotorischen Entwicklung im Alter von 1-2 Jahren⁵. Möglicherweise ist die Erhöhung dieser Serumwerte in diesem Bereich ein Ausdruck latenter struktureller Schädigungen der Astrogliazellen und weniger der Neuronen⁴³, die nicht notwendigerweise mit den eingesetzten Untersuchungsmethoden der psychomotorischen Entwicklung zu erfassen sind⁵. Ähnliche Studien bei Neugeborenen mit einer perinatalen Asphyxie bestätigten die Annahme, dass nur abnorme Werte des S-100B einen signifikanten prädiktiven Wert haben, um auf spätere Defizite in der psychomotorischen Entwicklung der Kinder hinzuweisen³¹².

9.4.2. Protein S-100B als Marker der Schädigung der Blut-Hirnschranke:

Wir konnten klinisch zeigen, dass abnorm erhöhte Serumkonzentrationen eine definitive zerebrale Affektion wie Blutung und Krämpfe und damit eine signifikante Schädigung des Zentralnervensystems anzeigen ^{176,177,301}. Ähnliche Beobachtungen wurden bei der perinatalen Asphyxie unterschiedlicher Schweregrade gemacht, wobei nur abnorm erhöhte Werte eine schwere bis moderate Asphyxie mit einem hohen prädiktiven Wert anzeigen konnten ³¹². Tierexperimentell waren bei den Tieren mit hohen S-100B Spiegeln kardiorespiratorische Komplikationen aufgetreten, die mit einer signifikanten Störung der systemischen Perfusion und Oxygenation vor und nach Beginn der EKZ einhergingen, und mit Komplikationen im klinischen Alltag vergleichbar sind. Bei diesen Tieren wurde frühzeitig unmittelbar nach dem Ereignis ein abnormer Anstieg des S-100B im Serum gemessen. Makroskopisch wurde semiquantitativ durch Gabe als Marker verwendeten Vitalfarbstoffes eine Öffnung der Blut-Hirnschranke festgestellt. Eine diffuse Öffnung der Blut-Hirnschranke, wie es anhand der großflächigen Extravasation des Farbstoffes Evans-Blue im Cortexbereich nachzuweisen war, verbirgt in sich ein fatales Risiko für das Hirngewebe bei längerer Reperfusion. Viele toxische Substanzen, Sauerstoffradikale und andere Metaboliten können unkontrolliert durch die nicht-intakte Schranke ins Hirngewebe passieren und die Neuronen schädigen ^{313,314}. Die meisten dieser Tiere waren zusätzlich kardial so beeinträchtigt, dass sie nicht von der EKZ zu entwöhnen waren. Der abnorme Anstieg des S-100B ist möglicherweise auch ein Ausdruck globaler Ischämie, die mit einer signifikanten Schädigung anderer Organe wie das Herz assoziiert ist, und hat damit einen zusätzlichen prädiktiven Wert im Hinblick auf die Gesamtprognose des Patienten ^{315,316}. In der klinischen Studie starben 11 von 15 Kindern mit abnormen Werten nach herzchirurgischen Eingriffen im postoperativen Verlauf ¹⁷⁷. S-100 α ist unter anderen im Herzmuskulator vorhanden ³¹⁷. Eine Kreuzreaktion durch den LIA-Test für S-100B ist unwahrscheinlich. Eine mögliche Konamination der Serumwerte des S-100B durch Freisetzung aus anderem Gewebe wie Fettzellen ist möglich. Die Konzentration des S-100B in diesen Zellen ist jedoch im Vergleich mit der S-100B Konzentration in den Astrozyten eher gering ¹⁵⁵. Der massive Anstieg der Konzentration des S-100B im Liquor spricht für eine signifikante zerebrale Beteiligung.

9.4.3. Protein S-100B als Parameter der Neuroprotektion

In einigen prospektiven klinischen Studien wurde das Protein S-100B seriell im Serum bestimmt, um den Einfluss pharmakologischer oder intraoperativer Maßnahmen auf die Serumkonzentrationen zu untersuchen ¹⁹⁷. In diesen Studien wurde der Einfluss der kontinuierlichen Behandlung mit

Nitruressid Natrium und der Einsatz der modifizierten Ultrafiltration auf die Serumwerte des astroglialen S-100B Proteins untersucht. Wie in allen Untersuchungen stieg die Serumkonzentration des S-100B unmittelbar nach der EKZ in beiden Gruppen signifikant an¹⁹⁷. Bei den behandelten Kindern und Neugeborenen wurden signifikant niedrigere Serumkonzentrationen nicht unmittelbar, sondern 24 Stunden nach Ende der EKZ festgestellt. Da die Halbwertszeit des S-100B im Serum weniger als zwei Stunden beträgt, sollten die Serumwerte 24 Stunden nach der Operation normalisiert sein¹⁸³. Im Vergleich zu den Kindern mit Nitruressidbehandlung blieben die Serumwerte des S-100B in den nicht-behandelten Kindern signifikant höher als die präoperativen Werte¹⁹⁷. Im Hinblick auf eine mögliche Kontamination der initial erhöhten Werte im Serum aus extrazerebralen Quellen^{184,318,319} scheint der verspätete Anstieg eine bessere Aussage über eine mögliche Weiterfreisetzung aus dem Gehirn zu liefern.

Aufgrund des potenten vasodilatativen Effektes des NO-Spenders Natrium Nitruressids (Nitruress) wurde ein protektiver Effekt in verschiedenen Modellen der Ischämie und Reperfusion in vitro und in vivo festgestellt^{195,320-322}. Gemäß vielen Ergebnissen in vitro wurde ein direkter antioxidativer Effekt von Nitruress in den Astrozyten^{195,196,323} und in den Endothelzellen^{191,193,324} gefunden. Wenn man annimmt, dass das gemessene S-100B im Serum aus geschädigten Astrozyten stammt, könnte die spätere Reduktion und schnellere Normalisierung der Serumwerte durch Nitruress als ein protektiver Effekt im Bereich der Blut-Hirnschranke gedeutet werden¹⁹⁷.

Inwieweit diese Beobachtung einen signifikanten protektiven Wert im Zentralnervensystem darstellt, ist jedoch aufgrund fehlender anderer neurophysiologischer und Follow-up-Daten bei diesen Kindern eher limitiert. Viele experimentelle Ergebnisse in Tiermodellen lassen trotzdem auf einen gewissen vorteilhaften Effekt durch die kontinuierliche intra- und postoperative Behandlung mit Nitruress in niedriger Dosierung schließen.

Seit der Einführung der modifizierten Ultrafiltration (MUF) in der Kinderherzchirurgie werden die klinischen Vorteile durch Entzug von Wasser und inflammatorischen Mediatoren im Gewebe nach der EKZ kontrovers diskutiert^{80,81,205,325}. Ein protektiver Effekt durch Entzug von akkumuliertem Wasser auf zerebraler Ebene ist unklar^{43,286}. Auch in diesem Zusammenhang wurde die Bestimmung des Astrozytären Ca^{++} -bindenden Protein S-100B als ein Marker eines möglichen Effektes eingesetzt. Hier zeigte sich, ähnlich wie nach der Behandlung mit Nitruress, bei den Kindern mit MUF eine signifikante spätere und nicht eine unmittelbare Abnahme der Serumkonzentrationen des S-100B nach EKZ. Aufgrund einer möglichen Kontamination der maximalen Werte des S-100B unmittelbar nach EKZ und der kurzen Halbwertszeit durch renale Elimination würde eine

persistierende Freisetzung und Serumerhöhung das Ausmass der Schädigung bzw. einer protektiven Antwort nach Intervention wie in diesem Zusammenhang widerspiegeln^{182,183}. Die Verbesserung in der gesamthämodynamischen Situation durch den Entzug von akkumuliertem Wasser im Gewebe nach MUF wurde möglicherweise auch in einer Verbesserung der zerebralen Perfusion und Oxygenation resultieren⁸⁰. Morphologische Veränderungen im Gehirn manifestierten sich initial nach hypothermer EKZ in den Astrogliazellen in Form von Schwellung der perivaskulären Astrozytenfüßchen, was möglicherweise ein Ausschwemmen vom löslichen Protein S-100B bewirken könnte^{43,206,301}. Die zusätzliche Rolle der Inflammation bei der endothelialen Schädigung nach normothermer und moderat-hypothermer EKZ wird vermutet^{44,326}. Auch ein Zusammenhang zwischen dem Anstieg der Cytokine IL-8, IL 6 und des S-100B wurde bei pädiatrischen Patienten nach EKZ gefunden⁴⁰. Durch die MUF sollen viele inflammatorische Mediatoren aus dem Kreislauf am Ende der EKZ eliminiert werden^{204,327}. Inwieweit der schnelle spätere Abfall des S-100B im Serum im Zusammenhang mit einer Reduktion der inflammatorischen Antwort durch MUF steht, bleibt unklar⁴⁰. Cytokine wurden bei diesen Patienten nicht gemessen.

9.4.4. Wertigkeit der Hirnmarker im Serum und Liquor

Zusätzlich zur Bestimmung des astrozytären Proteins S-100B wurden andere neuronale Ca^{++} -bindende Proteine wie Parvalbumin und Calretinin sowie die neurospezifische Enolase (NSE) im Serum und im Liquor bestimmt. Diese Marker sind in unterschiedlichen Subpopulationen von Neuronen vorhanden und werden bei Membranschädigung oder Zelluntergang freigesetzt. Im Gegensatz zur Kinetik des Proteins S-100B im Serum waren die neuronalen Marker, NSE, Parvalbumin und Calretinin im Serum trotz des hypothermen Stillstands von zwei Stunden Dauer nicht angestiegen, sondern eher signifikant abgefallen. Diese Marker sind jedoch am Ende des Experiments im Liquor im Vergleich zu den Ausgangswerten um mehr als das Hundertfache angestiegen (Abb. 7.4.6). Da die neuronalen Marker Parvalbumin, Calretinin und NSE ein viel größeres Molekulargewicht als das Protein S-100B aufweisen (20000 vs. 76.000 KD), ist ihre Passage durch eine intakte Blut-Hirnschranke eher limitiert. Der Nachweis dieser neuronalen Marker im Serum war trotz des massiven Anstiegs im Liquor nicht möglich (Abb. 7.4.6-2). Der Abfall der Serumkonzentration der neuronalen Marker nach dem Anschluß an der EKZ ist möglicherweise durch Hämodilution der vorhandenen Konzentrationen ohne weitere Freisetzung aus dem Zentralnervensystem bedingt.

Das zirkulierende Blutvolumen wird mit Anschluß an der EKZ um das Dreifache vergrößert. Die Messung der neuronalen Marker im Liquor und nicht im Serum ist für die Evaluation möglicher zerebraler Schädigungen nach EKZ eher geeignet. Der signifikante Anstieg der

Serumkonzentrationen des Proteins S-100B, trotz des Missverhältnisses zwischen dem Liquor und Serumvolumen, weist auf eine signifikante Passage vom Gehirn in die Blutbahn hin. Das freigesetzte S-100B wird in ein viel größeres Medium verteilt (Liquor ca 3 ml, Blut 160 ml bei 2 kg Ferkel), was möglicherweise die niedrigeren Konzentrationen im Serum im Vergleich mit dem Liquor erklärt.

Obwohl in der letzten Zeit Erkenntnisse über eine Kontamination des gemessenen S-100B im Serum aus anderen Quellen wie Fettzellen publiziert wurden ^{318,319}, zeigen unsere Ergebnisse einer massiven Erhöhung des S-100B eine spezifische Schädigung auf zerebraler Ebene im Zusammenhang mit der EKZ und dem tief hypothermen Kreislaufstillstand. Der signifikante Anstieg der Konzentrationen des S-100B sowohl im Liquor als auch im Serum, trotz des Missverhältnisses der Konzentrationen in beiden Medien, weist auf einen zerebralen Ursprung der gemessenen Werte hin. Sicherlich ist die Gewinnung von Liquorproben in der klinischen Praxis bei kleinen Kindern nach herzchirurgischen Eingriffen nicht einfach durchzuführen. Die abnorm erhöhten Werte im Serum konnten sowohl klinisch also auch tierexperimentell eine Hirnschädigung anzeigen. Daher eignet sich das Astrogliazellprotein S-100B, und weniger die neuronalen Proteine, als Marker der globalen Zellschädigung ³¹². Zusätzlich kommt das Astrogliazellprotein S-100B in allen Hirnregionen vor, und eignet sich somit als Marker einer globalen und fokalen ischämischen Schädigung. Im Hinblick auf eine mögliche Kontamination aus anderem Gewebe nach EKZ sollten nicht nur einmalige sondern serielle Messungen während des postoperativen Verlaufs erfolgen. Eine Neusynthese vom protein S-100B in den Astrozyten sollte mit gezielten Studien künftig untersucht werden.

9.5. Neuroprotektive Strategien während tief hypothermem Kreislaufstillstand

Die geschilderten Ergebnisse zeigten sowohl klinisch als auch tierexperimentell signifikante Änderungen vom Ausgangswert in den erhobenen Parametern der zerebralen Oxygenation, Perfusion sowie der biochemischen Marker im Serum im Zusammenhang mit der nicht-pulsatilen Perfusion der EKZ. Der Pathomechanismus einer signifikanten Zellschädigung in diesem Zusammenhang ist multifaktoriell und bei äquivalenten physiologischen Perfusionbedingungen eher als latent oder mild zu erwarten. Selbstverständlich ist eine signifikante Zellschädigung bei Unterbrechung der Zirkulation am wahrscheinlichsten zu finden. Daher ist eine effektive systemische Kühlung des Körpers und vor allem des Gehirns eine wichtige Voraussetzung, um den Metabolismus insgesamt für Sauerstoff und Glucose signifikant zu erniedrigen und die Ischämie-Schwelle zu erhöhen.

9.5.1. Protektiver Effekt der Hypothermie

Der Kreislaufstillstand in tiefer Hypothermie ist eine der ältesten Methoden, die ein blutfreies Feld bei der Korrektur komplexer Malformationen des Herzens und der herznahen Gefäße ermöglichte^{58,328}. In den letzten 50 Jahren unterlag der Einsatz der Ganzkörperkühlung während herzchirurgischer Maßnahmen einer Reihe von Modifikationen und Verbesserungen. Während die ersten Operationen am offenen Herzen eine Oberflächen-Kühlung des gesamten Körpers in einem Eisbad erforderte³²⁸, gelingt heute eine systemische Blutkühlung in verschiedenen Graden und Geschwindigkeiten, dank vieler Verbesserungen der EKZ, problemlos.

Der Einsatz der Hypothermie wird in verschiedenen Institutionen jedoch sehr unterschiedlich gehandhabt, was die unterschiedlichen Ergebnisse der Neuroprotektion erklärt^{37,49,87,292,329,330}. Während einige Kliniken eine systemische Kühlung mit niedrigem Fluss bevorzugen, werden die Patienten in anderen Kliniken mit viel höheren Flussraten perfundiert und diese bis zum Ende der Kühlung fortgesetzt. Auch die Regulation des Säurebasen-Haushaltes während der Kühlung an der EKZ ist für die Gewebepерfusion von Bedeutung³³¹. Während einige Institutionen die Kühlung mit der Alpha-Stat-Methode (*unkorrigierte pCO₂ und pH-Werte für die absinkende Temperatur*) durchführen, bevorzugen andere die Korrektur des Säurebasen-Haushaltes entsprechend der Kühlung (pH-Stat Methode)^{39,92,331}.

Die Ergebnisse unserer Untersuchung sowohl am Kaninchen als auch bei den neonatalen Schweinen zeigten keine signifikante neuronale Schädigung nach 60 minütigem Kreislaufstillstand, wenn die systemische Kühlung am Bypass mit höheren Flussraten und höheren Perfusionsdrücken

sowie einem einheitlichen Einsatz der Alpha-Stat Methode erfolgte. Sicherlich war eine signifikante neuronale Schädigung nach Verdopplung der Kreislaufstillstandszeit zu erwarten. Die Stillstandszeit wurde in den nächsten Versuchsreihen verlängert, um bewusst histologisch eine hypoxische Schädigung zu provozieren. Anhand weiterer pharmakologischer Interventionen sollte es dann der protektive Effekt in repräsentativen Regionen des Hippocampus quantitativ evaluiert werden ²⁰⁶. Auch nach zweistündlichem Kreislaufstillstand in tiefer Hypothermie war es trotzdem erstaunlich, wie viele intakte Neurone noch zu finden waren. Diese Befunde unterstreichen die Rolle der systemischen Kühlung mit hohen Flussraten und hohem Perfusionsdruck, um eine effektive Gewebekühlung im Gehirn vor dem Stillstand zu erreichen ⁵⁷.

9.5.2. Protektiver Effekt der Vorbehandlung mit Steroiden

Die systemische Vorbehandlung mit hochdosierten Steroiden zeigte tierexperimentell nicht den erhofften protektiven Effekt. Die intrathekale Applikation unter Umgehung der Blut-Hirnschranke konnte jedoch die Zahl der hypoxisch-nekrotischen Neurone im Hippocampus signifikant reduzieren ²³³.

Langley et al untersuchten in einem ähnlichen Modell den Einfluss der Vorbehandlung mit Steroiden in gleicher Dosierung auf die zerebrale Perfusion und Oxygenation und fanden eine verbesserte regionale und globale Perfusion bei den vorbehandelten Tieren ⁹³. Aufgrund dieser Ergebnisse schlussfolgerten sie einen protektiven Effekt, ohne jedoch eine morphologische Bearbeitung des Gehirns durchzuführen ⁹³. Im Gegensatz zu den Ergebnissen von Langley et al. fanden wir in unserer Studie nur bei den intrathekal vorbehandelten Tieren einen signifikanten Anstieg der regionalen zerebralen Perfusion. Diese Diskrepanz ist möglicherweise durch die unterschiedlichen Methoden zur Quantifizierung der zerebralen Perfusion bedingt. Die morphologische Quantifizierung der hypoxischen Schädigung im Hippocampus, Gyrus cinguli und Nucleus caudatus zeigte **keine** Reduktion der hypoxisch-nekrotischen Neurone durch systemische Vorbehandlung mit Methylprednisolon. Die intrathekale Gabe von Methylprednisolon vor dem hypothermen Kreislaufstillstand unter Umgehung der Blut-Hirnschranke bewirkte jedoch eine signifikante Reduktion der hypoxischen Schädigung. Mehrere Mechanismen gegen die Ischämie und die Schädigung während der Reperfusion wurden den Steroiden im Zentralnervensystem zugeschrieben, wie die abschwellende ^{245,247}, die antioxidative ³³²⁻³³⁴, die antiinflammatorische ^{335,336} sowie die antiexzitatorische Wirkung ²⁴⁶. Das systemisch verabreichte Steroid scheint jedoch nicht eine ausreichende Konzentration auf zerebraler Ebene zu erreichen, um diese o.g Wirkungen gegen die zerebrale Ischämie zu entfalten ³³⁷. Das Fehlen solcher protektiven Wirkung nach systemischer Gabe lässt auf eine geringe Penetration des Methylprednisolon durch die Blut-

Hirnschranke vermuten³³⁷. Systemisch verabreichte Steroide werden an spezifischen Steroidrezeptoren auf der Endothelseite der Blut-Hirnschranke gebunden und können nur in geringen Mengen die Blut-Hirnschranke passieren³³⁸. Die Neuronen, insbesondere die unreifen, können ihre Selbstzerstörung durch Hochregulation von programmierten Prozessen (Apoptose) auslösen²²⁸. In der Postnatalzeit ist die Apoptose besonders häufig im Subiculum und in den Zellkernen der Brücke nach einer Ischämie und Reperfusion zu finden^{339,340}. Dieses Läsionmuster wurde bei den untersuchten Gehirnen verstorbener Kinder mit angeborenen Herzfehler beobachtet³³. Dagegen wurden solche neuropathologischen Befunden nicht bei den Ferkeln nach tief hypothermem Kreislaufstillstand gefunden.

Die Vorbehandlung mit Methylprednisolon scheint signifikant die Zahl der apoptotischen und TUNEL-positiven Neuronen im Gyrus dentatus des Hippocampus zu erhöhen^{47,233,341}. Da die Apoptose häufiger bei unreifen als unreifen Zellpopulationen vorkommt, könnte dies die regionale Vulnerabilität des Gyrus dentatus für Apoptose, wo überwiegend unreife Kernzellen vorkommen, zum Teil erklären³⁴².

Die Ursache für die vermehrte Induktion apoptotischer Zellen im Zusammenhang mit Methylprednisolon ist nicht gänzlich geklärt. Alterationen des intrazellulären Ca^{++} -Haushaltes durch Einstrom von Ca^{++} -Ionen von außen oder die Erhöhung des intrazellulären Ca^{++} -Spiegels können die Induktion des sekundären programmierten Zellsterbens auslösen^{214,215,223,343}. Intrazelluläres Kalzium führt zur enzymatischen Aktivierung von Lipasen, Proteasen und Endonucleasen, die eine Fragmentation der DNA und einen Zellabbau bewirken. Außerdem beeinflusst das Kalzium den phosphorylierten Zustand vieler Proteine und stört damit die Aktivität von Enzymen, Rezeptoren und Genexpression, die eine Gegenregulation bewirken könnten^{212-214,344}. Die Aktivierung der Steroidrezeptoren, die nicht nur am Endothel, sondern auch an vielen Neuronen vorhanden sind, beeinflusst die Ca^{++} -Homöostase in den Astrozyten und anderen benachbarten Neuronen^{338,345}. Ob das Eingreifen in der Ca^{++} -Haemostase durch die Steroide die Zellnekrose und Apoptose nach der Ischämie begünstigt, ist nicht auszuschließen^{213-215,223,346}. Im normalen Zustand spielen eine Reihe von Genen und Proteinen der Bcl-2 Familie eine wichtige Rolle in der Signalübertragung und Regulierung der pro- und antiapoptotischen Prozesse²²⁸. Neue Untersuchungen im Hippocampus der Ratte zeigten, dass die Aktivierung des Steroidrezeptors zu einem Missverhältniss von proapoptotischen gegen antiapoptotischen Molekülen führt²³¹. Daher könnten die Steroide eine wichtige Rolle bei der Apoptoseinduktion auf molekularer Ebene spielen. Hinweise auf die Rolle der Steroide in der Induktion von Apoptose in anderen Zellorganellen wurden in mehreren Studien dokumentiert^{222,347,348}. Die Apoptose ist im

Gegensatz zur Nekrose energieabhängig²²⁴. Inwieweit die Hyperglykämie und die erhöhte Perfusion in einigen Hirnregionen eine Rolle bei der zusätzlichen Energiezufuhr und damit bei der Begünstigung apoptotischer Prozesse in den Neuronen spielt, ist unklar. Kurth et al. berichtete in einem ähnlichen Tiermodell über einen Zusammenhang zwischen dem Ausmaß der Apoptose und der Hyperglykämie während der EKZ⁴⁷.

Die Rolle der Steroide im Zentralnervensystem bei unreifen Neugeborenen und Feten wird zunehmend kontrovers diskutiert³⁴⁹. Sowohl klinisch als auch tierexperimentell verdichten sich die Hinweise auf eine ernste Nebenwirkung der systemischen Behandlung mit Steroiden im unreifen Zentralnervensystem³⁴⁹. Die Indikationsstellung zur Verabreichung von Steroiden im Neugeborenenalter wird in zunehmendem Maße vorsichtiger gestellt. Zwei neue Follow-up-Studien haben einen signifikanten negativen Einfluss der Steroide bei der Behandlung der bronchopulmonalen Dysplasie auf die psychomotorische Entwicklung im späteren Alter gezeigt³⁵⁰.

Wir konnten mit dieser Studie zum ersten mal auf die signifikante Nebenwirkung eines Medikamentes hinweisen, welches routinemäßig in der Kinderherzchirurgie eingesetzt wird. Die Wirkung und Nebenwirkung vieler kardialer und nicht-kardialer Medikamente im unreifen Zentralnervensystem nach solchen nicht-physiologischen Bedingungen der EKZ sind weiterhin nicht gänzlich geklärt und bedürfen einer ähnlichen Überprüfung im Tierexperiment.

9.5.3. Protektiver Effekt der Vorbehandlung mit FK501

Andere Medikamente, die im Zusammenhang mit der Herzchirurgie und der Organtransplantation eingesetzt werden und zunehmend nach neuen Erkenntnissen eine Rolle im Zentralnervensystem spielen, sind die Immunsuppressiva FK506 und Cyclosporin A. Daher wurden beide Präparate nach ihrer Wirkung im Zentralnervensystem im Zusammenhang mit der EKZ und tiefhypothermen Kreislaufstillstand in unserem Tiermodell überprüft.

Anhand der quantitativen histologischen Bearbeitung der Gehirne der mit FK506 vorbehandelten Tieren konnte festgestellt werden, dass eine signifikante Reduktion der hypoxisch-nekrotischen Zellen in den Hippocampus-Regionen CA1 und CA 4 vorlag. Wie in vielen experimentellen Studien gezeigt wurde, scheint die protektive Wirkung des FK506 auf einer Hemmung der neuronalen NO-Synthetase zu beruhen^{270,351}.

Mehrere experimentelle Studien haben einen neuroprotektiven Effekt des FK506 in verschiedenen Formen der Ischämie-Reperfusion des Gehirns und anderen Organen gezeigt²⁷⁰. FK506 hemmt die

Neurotoxizität der NMDA-Calcium-Kaskade in primären corticalen Zellkulturen und verhindert möglicherweise die Dephosphorylation der NO-Synthetase und damit die Bildung von NO²⁷⁰.

In einem Insulin-induzierten Hypoglykämie-Modell zeigte sich ein protektiver Effekt auf die mitochondriale Schwellung nach Behandlung mit Cyclosporin und nicht mit FK506³⁵². Außerdem zeigte FK506 eine Erhaltung der cAMP-Bindungskapazität und damit der intrazellulären Signaltransduktion trotz einer Ischämiephase von zwei Stunden²⁷¹.

Wie auch bei der pharmakologischen Intervention mit Methylprednisolon zeigte sich in unserem Modell eine signifikante Vermehrung apoptotischer und TUNEL-positiver Neuronen im Gyrus dentatus. Hinsichtlich der Wechselwirkung von FK506 mit der Induktion von Apoptose im Zentralnervensystem sind widersprüchliche Angaben in der Literatur vorhanden^{353,354}. Etablierte klinisch relevante Modelle zur Evaluation des Einflusses von verschiedenen Medikamenten im Zentralnervensystem während tiefhypothermem Kreislaufstillstand sind nicht vorhanden. Während Yardin et al eine antiapoptotische Wirkung in neuronalen Zellkulturen durch FK506 nachwies³⁵³, fanden Koche et al eine vermehrte apoptotische Zellveränderung in Zellkulturen von Endothelzellen zerebraler Arteriolen und spekulierten damit auf eine Schädigung der Blut-Hirnschranke durch FK506^{354,355}. Auch Asai et al fanden eine anti-apoptotische Wirkung in neuronaler Zellkultur, sowohl bei CsA als auch bei FK506³⁵⁶. Sicherlich liegt hier eine unterschiedliche Ischämieform und ein unterschiedliches Wirkungsziel von Zellkulturen vor, was die Diskrepanz der Ergebnisse in der Literatur erklärt^{353,356,357}. Von besonderem Interesse sind die Ergebnisse von Alexanian AR et al. hinsichtlich der Rolle von S-100B in den neuroprotektiven Mechanismen von CsA und FK506 in der zerebralen Ischämie und Reperfusion³⁵⁸. Das Überleben der Neuronen im Frontalhirn eines Kükenembryos war von der Dosis des astroglialen Proteins S-100B abhängig³⁵⁸. Sicherlich sind hier andere Konzentrationen wirksam als die gemessenen massiv erhöhten Konzentration des S-100B nach Zellschädigung vieler Astrozyten. Inwieweit ein Zusammenhang zwischen der erhöhten Konzentration von S-100B im Serum und Liquor und dem neuroprotektiven Effekt von CsA und FK506 besteht, ist bis jetzt unklar.

Auf der anderen Seite zeigten aktuelle Arbeiten eine erhöhte toxische Wirkung auf die Blut-Hirnschranke nach Behandlung mit Cyclosporin und nicht mit FK506³⁵⁵. Die vasokonstruktive Wirkung von Endothelin nach Ischämie-Reperfusion scheint eine wichtige Rolle bei der Beeinträchtigung der Mikrozirkulation zu spielen. Eine signifikante Hemmung der Endothelinexpression und damit die Erhaltung einer normalen Mikrozirkulation sowie eine bessere

Organprotektion wurde durch Vorbehandlung mit FK506 und nicht mit Cyclosporin nach einer Ischämie-Reperfusion gefunden ³⁵⁹.

Neurologische Komplikationen wurden nach orthotoper Lebertransplantation und Behandlung mit FK506 und Prednisolon beobachtet ³⁶⁰. Leukoencephalopathie wurde bei organtransplantierten Kindern mit anschließender immunsuppressiver Behandlung durch FK506 gefunden ³⁶¹. Der Pathomechanismus solcher Komplikationen nach invasiven chirurgischen Eingriffen ist sicher als multifaktoriell anzugeben, und kann nicht allein auf die immunsuppressive Behandlung zurückgeführt werden. Die Gliatoxizität ist unter der besonderen Berücksichtigung der Oligodendroglia und der Myelinisierungsgliose des Großhirnmarklagers bei Neugeborenen in gesonderten Untersuchungen Rechnung zu tragen.

9.5.4. Protektiver Effekt der Vorbehandlung mit Cyclosporin A

In dieser Versuchsreihe konnten wir auch eine signifikante Reduktion der hypoxischen Neuronen im Hippocampus und eine Verbesserung der zerebralen Oxygenation während und nach dem tief hypothermen Kreislaufstillstand durch eine einmalige Gabe von hochdosierten Cyclosporin A nachweisen.

Einer der wichtigsten Pathomechanismen der neuronalen Zellschädigung durch Ischämie-Reperfusion im Gehirn ist die Störung des Ca^{++} -Haushaltes im intrazellulären Raum ^{267,362-364}. Mehrere experimentelle Studien haben einen neuroprotektiven Effekt des Cyclosporins in verschiedenen Formen der Ischämie-Reperfusion des Gehirns und in anderen Organen gezeigt ^{268,365}. Während des Kreislaufstillstandes mit Unterbrechung der Energiezufuhr können Alterationen der energieabhängigen Iontentransporter zur Störung der Ca^{++} -Homöostase führen ^{366,367}. Insbesondere stellt der Einstrom von Kalzium in die Mitochondrien ein ernstes Risiko für die neuronale Zellintegrität dar ^{213,214,223,368}. Der neuroprotektive Effekt von Cyclosporin-A beruht auf der Hemmung des Ca^{++} -Einstromes durch die sogenannten Membran-Permeabilitäts-Poren (*membrane permeability transport pores, mtPTP*) in die Mitochondrien ^{213,223,267,368}.

Die kontinuierliche Registrierung der intrazellulären und intravaskulären Oxygenation mit NIRS zeigte einen signifikant langsameren Abfall des intrazellulären Cyt.Ox aa3-Signals als bei den Kontrolltieren insbesondere während der Ischämiephase. Da die Signalmessung der Cyt.Ox aa3 mit NIRS in enger Beziehung zum Energieträger Adenosintriphosphat (ATP) und Creatinin (Cr.) in den Mitochondrien steht ^{142,144}, sind diese Veränderungen möglicherweise Ausdruck einer guten

Erhaltung der mitochondrialen Integrität und des mitochondrialen Energieträgers in der hypothermen Stillstandsphase zu interpretieren²⁶⁷.

Aufgrund der unterschiedlichen experimentellen Ansätze in diesen Modellen wurden widersprüchliche Ergebnisse hinsichtlich der Reduktion der nekrotischen und apoptotischen Schädigung beider Immunsuppressiva nach Ischämie beobachtet^{262,268,353,354}. Im Hinblick auf die bedeutende Rolle von Ca^{++} in den verschiedenen Pathomechanismen der ischämischen Zellschädigung bietet die Wirkung von Cyclosporin durch die Erhaltung der funktionellen und strukturellen Integrität der Mitochondrien als *Kraftwerke* der Energiezufuhr eine attraktive protektive Rolle in den Neuronen an. Diese Wirkung könnte die dramatische protektive Wirkung im Zentralnervensystem gegen die Ischämie in unserem Modell und anderen experimentellen Modellen der Ischämie und Reperfusion zum Teil erklären^{262,268,352,369,370}.

Erstaunlicherweise, war das Verhalten des zerebralen Flussmusters bei den mit Cyclosporin vorbehandelten Tieren eher langsamer als bei den Kontrolltieren. Cyclosporin wirkt vasokonstriktiv in vielen Organen wie der Niere und ist auch für die oft beobachtete Hypertension nach Organtransplantation mitverantwortlich³⁷¹. In wie weit die regionale zerebrale Perfusion beeinträchtigt ist, ist unklar. Leider war eine komplette Messung der regionalen Hirnperfusion nicht bei allen Tieren gelungen. Im Gegensatz zu den Ergebnissen bei der Steroidvorbehandlung, wo ein protektiver Effekt mit erhöhter zerebraler Perfusion festgestellt wurde, wurde bei den mit Cyclosporin vorbehandelten Tieren ein protektiver Effekt ohne erhöhte Perfusion gefunden. Diese Beobachtungen unterstreichen noch einmal, dass ein Anstieg der zerebralen Perfusion nach der Ischämie mit resultierendem statistisch signifikanten Unterschied nicht unbedingt mit einem protektiven Effekt der jeweiligen Intervention assoziiert ist^{93,233}. Bevor es zu einem klinischen Einsatz von Cyclosporin kommt, sind weitere Fragen wie Dosis, Evaluierung weiterer Nebenwirkungen und weitere Beurteilung des Immunstatus zu klären. Zusätzlich ist die Verfügbarkeit von pharmakologisch effektiven Dosen auf zerebraler Ebene bei den klinisch-therapeutischen Dosen durch die begrenzte Passage von Cyclosporins durch die Blut-Hirnschranke limitiert^{263,372,373}.

Eine signifikante Verminderung oder Vermehrung der Apoptose im Gyrus dentatus oder anderen Hirnregionen war durch Cyclosporin in diesem Tiermodell nicht feststellbar. In anderen Studien wurde die Apoptose in den Oligodendrogliazellen vermehrt gefunden³⁷⁴. Die Myelinisierung bei kleinen Kindern nach Herztransplantation in der frühen Postnatalzeit und Transplantaterhalt durch Cyclosporin sollte Aufschluss über die Langzeitfolgen der Glai-Apoptose geben.

9.6. Zusammenfassung:

Die vorliegende Arbeit setzt sich mit den funktionellen und strukturellen Veränderungen im Zentralnervensystem im Zusammenhang mit angeborenen Vitien und deren chirurgischer Behandlung sowohl klinisch als auch tierexperimentell auseinander mit dem Ziel, neuroprotektive Strategien zu entwickeln. Wir haben mit den verfügbaren Methoden der Neuroüberwachung die charakteristischen Verläufe definiert und beschrieben. Zusätzlich wurden diese nicht-invasiven Methoden wie die Nahinfrarot-Spektroskopie sowohl klinisch als auch tierexperimentell validisiert.

Inwieweit diese Veränderungen während und nach extrakorporaler Zirkulation eine Aussage hinsichtlich einer signifikanten funktionellen Alteration bedeuten, kann mit absoluter Sicherheit nicht beantwortet werden. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass diese Methoden eine zuverlässig signifikante globale Alteration in der Oxygenation und Perfusion anzeigen. Alternative Methoden, die nicht-invasiv und bettnah Informationen über Veränderungen in der zerebralen Hämodynamik oder des Sauerstoffmetabolismus unter physiologischen und nicht-physiologischen Bedingungen wie dem tiefhypothermen Kreislaufstillstand liefern, sind nicht verfügbar.

Durch das Erarbeiten und die Charakterisierung des Verlaufs der Serumwerte des astroglialen Proteins S-100B wurde die klinische Wertigkeit genauer definiert. Es konnte klinisch und tierexperimentell gezeigt werden, dass die abnorm erhöhten Werte des S-100B im Serum von einem signifikanten diagnostischen Wert sind. Im Gegensatz dazu wurde die untergeordnete Rolle der Bestimmung von neuronalen Marker im Serum bestätigt. Durch die tierexperimentellen Arbeiten wurde erstmals gezeigt, dass diese Marker in den Liquor freigesetzt werden, aufgrund ihres großen Molekulargewichts jedoch nicht oder nicht in messbaren Konzentrationen in die Blutbahn gelangen. Die Astrozyten sind aufgrund ihrer topographischen und funktionellen Lage die ersten Zellen, die am ehesten von Hypoxie-Ischämie und EKZ-Reperfusion betroffen und geschädigt wird. Deshalb sollte eine zukünftige Neuroprotektion in zunehmenden Maße auch eine Glairotektion bedeuten.

Die überwiegenden morphologischen Veränderungen nach EKZ im Gehirn und anderen Organen sind eine Membranschädigung und Wasserakkumulation in den Zellstrukturen um die Kapillaren. Diese initiale morphologische Veränderung wurde unabhängig vom Dauer der EKZ oder dem Einsatz des tiefhypothermen Kreislaufstillstandes in den Astrozyten festgestellt. Die neuronale Zelldegeneration war nach dem tiefhypothermen Kreislaufstillstand überwiegend in Form von hypoxischer Zellnekrose. Die apoptotische Zelldegeneration trat zellspezifisch im Gyrus dentatus des Hippocampus auf.

Vor allem konnte die bedeutende protektive Rolle der Hypothermie und der hypothermen Perfusion der EKZ demonstriert werden. Bei einer effektiven systemischen Kühlung könnte ein Kreislaufstillstand ohne signifikante neuronale Schädigungen überstanden werden.

Die EKZ und der tiefhypotherme Kreislaufstillstand stellen an sich für das unreife Gehirn eine *grobe* nicht-physiologische Situation dar. Daher sollte die Verabreichung von "*prophylaktischen*" pharmakologischen Maßnahmen wie Steroidvorbehandlung bei diesen unreifen Wesen kritischer und überlegter angewandt werden. Obwohl eine signifikante Neuroprotektion durch Gabe von FK506 und Cyclosporin unter extremen Bedingungen der EKZ und tiefhypothermem Kreislaufstillstand erzielt wurde, bedarf es vor einer klinischen Anwendung weiterer tierexperimenteller und klinischer Überprüfungen.

Die genaue Ursache der latenten Störung der psychomotorischen Entwicklungsstörung, wie es von uns und anderen im späteren Schulalter nach Korrekturoperationen festgestellt wurde, bleibt nicht gänzlich geklärt. Wir hoffen weiterhin, daß Neugeborene komplexe chirurgische Eingriffe überleben und das Erwachsenenalter mit guter Lebensqualität genießen. Die Analyse der Hirnmorphologie Verstorbener mit angeborenen Vitien zeigt Untergewichtigkeit, Wachstumsretardierung und das Vorkommen von kongenitalen Malformationen im Zentralnervensystem, und zwar unabhängig von der chirurgischen Maßnahme und dem Anschluss an die EKZ. Zusätzlich zu den Risikofaktoren während der chirurgischen Behandlung sind kongenital prädisponierende Faktoren im Zentralnervensystem im Zusammenhang mit dem angeborenen Herzfehler an sich ursächlich für die psychomotorische Entwicklungsstörung bei Patienten mit congenitalen Herzfehlern.

10. Referenzen

- 1.; BELLINGER DC, JONAS RA, RAPPAPORT LA, WYPIJ D, WERNOVSKY G, KUBAN KC, BARNES PD, HOLMES GL, HICKEY PR, STRAND RD, ET AL; Developmental and neurologic status of children after heart surgery with hypothermic circulatory arrest or low-flow cardiopulmonary bypass [see comments]; N Engl J Med; 1995; **332**; 549-55.
 - 2.; BELLINGER DC, RAPPAPORT LA, WYPIJ D, WERNOVSKY G, NEWBURGER JW; Patterns of developmental dysfunction after surgery during infancy to correct transposition of the great arteries; J Dev Behav Pediatr; 1997; **18**; 75-83.
 - 3.; BELLINGER DC, WYPIJ D, KUBAN KC, RAPPAPORT LA, HICKEY PR, WERNOVSKY G, JONAS RA, NEWBURGER JW; Developmental and neurological status of children at 4 years of age after heart surgery with hypothermic circulatory arrest or low-flow cardiopulmonary bypass; Circulation; 1999; **100**; 526-32.
 - 4.; HOVELS-GURICH HH, SEGHAJE MC, DABRITZ S, MESSMER BJ, VON BERNUTH G; Cognitive and motor development in preschool and school-aged children after neonatal arterial switch operation; J Thorac Cardiovasc Surg; 1997; **114**; 578-85.
 - 5.; HOVELS-GURICH HH, SEGHAJE MC, SIGLER M, KOTLAREK F, BARTL A, NEUSER J, MINKENBERG R, MESSMER BJ, VON BERNUTH G; Neurodevelopmental outcome related to cerebral risk factors in children after neonatal arterial switch operation; Ann Thorac Surg; 2001; **71**; 881-8.
 - 6.; KIRKHAM FJ; Recognition and prevention of neurological complications in pediatric cardiac surgery; Pediatr Cardiol; 1998; **19**; 331-45.
 - 7.; FERRY PC; Neurologic sequelae of open-heart surgery in children An 'irritating question'; Am J Dis Child; 1990; **144**; 369-73
 - 8.; WERNOVSKY G, STILES KM, GAUVREAU K, GENTLES TL, DUPLESSIS AJ, BELLINGER DC, WALSH AZ, BURNETT J, JONAS RA, MAYER JE, JR., NEWBURGER JW; Cognitive development after the Fontan operation; Circulation; 2000; **102**; 883-9.
 - 9.; NEWBURGER JW, JONAS RA, WERNOVSKY G, WYPIJ D, HICKEY PR, KUBAN KC, FARRELL DM, HOLMES GL, HELMERS SL, CONSTANTINOU J, ET AL; A comparison of the perioperative neurologic effects of hypothermic circulatory arrest versus low-flow cardiopulmonary bypass in infant heart surgery; N Engl J Med; 1993; **329**; 1057-64.
-

- 10.; FERRY PC; Neurologic sequelae of cardiac surgery in children; Am J Dis Child; 1987; **141**; 309-12.
 - 11.; WALSH AZ, MORROW DF, JONAS RA; Neurologic and developmental outcomes following pediatric cardiac surgery; Nurs Clin North Am; 1995; **30**; 347-64.
 - 12.; DELEON S, ILBAWI M, ARCILLA R, CUTILLET A, EGEL R, WONG A, QUINONES J, HUSAYNI T, OBEID M, SULAYMAN R, ET AL; Choreoathetosis after deep hypothermia without circulatory arrest [see comments]; Ann Thorac Surg; 1990; **50**; 714-9.
 - 13.; DU PLESSIS AJ; Neurologic complications of cardiac disease in the newborn; Clin Perinatol; 1997; **24**; 807-26.
 - 14.; EKE CC, GUNDRY SR, BAUM MF, CHINNOCK RE, RAZZOUK AJ, BAILEY LL; Neurologic sequelae of deep hypothermic circulatory arrest in cardiac transplant infants; Ann Thorac Surg; 1996; **61**; 783-8.
 - 15.; OKITA Y, TAKAMOTO S, ANDO M, MOROTA T, YAMAKI F, MATSUKAWA R, KAWASHIMA Y; Coagulation and fibrinolysis system in aortic surgery under deep hypothermic circulatory arrest with aprotinin; the importance of adequate heparinization; Circulation; 1997; **96**;II-376-81
 - 16.; VISCONTI KJ, BICHELL DP, JONAS RA, NEWBURGER JW, BELLINGER DC; Developmental outcome after surgical versus interventional closure of secundum atrial septal defect in children; Circulation; 1999; **100**; II145-50.
 - 17.; JONAS RA; Advances in surgical care of infants and children with congenital heart disease; Curr Opin Pediatr; 1995; **7**; 572-9.
 - 18.; SCHOLZ W; Hirnveränderung bei den mit Blausucht einhergehenden kardio-pulmonalen Erkrankungen; In Handbuch der speziellen Pathologischen Anatomie und Histologie Erkrankungen des Zentralnervensystems II; 1985; ; Berlin, Göttingen, Heidelberg Springer-Verlag 1353-1391
 - 19.; HANNA R; Cerebral abscess and paradoxical emboli associated with congenital heart disease; Amer J Dis Childr; 1941; **62**; 555
 - 20.; EGUCHI H; Über Gehirnveränderung bei Herzfehlern; Fukuoka-Ikwadaigaku- Zasshi (jpn.), Dtsch Zus.fass86-87; . 1933; **26**; 68-87
-

- 21.; WONG BI, MCLEAN RF, NAYLOR CD, SNOW WG, HARRINGTON EM, GAWEL MJ, WOODS RB, FREMES SE; Central-nervous-system dysfunction after warm or hypothermic cardiopulmonary bypass; *Lancet*; 1992; **339**; 1383-4.
- 22.; FESSATIDIS IT, THOMAS VL, SHORE DF, HUNT RH, WELLER RO, GOODLAND F, ROWE D, VENETIKOU MV, BLOOM SR; Assessment of neurological injury due to circulatory arrest during profound hypothermia An experimental study in vertebrates; *Eur J Cardiothorac Surg*; 1993; **7**; 465-72
- 23.; MOLINA JE, EINZIG S, MASTRI AR, BIANCO RW, MARKS JA, RASMUSSEN TM, CLACK RM; Brain damage in profound hypothermia Perfusion versus circulatory arrest; *J Thorac Cardiovasc Surg*; 1984; **87**; 596-604
- 24.; MUJSCE DJ, TOWFIGHI J, YAGER JY, VANNUCCI RC; Neuropathologic aspects of hypothermic circulatory arrest in newborn dogs; *Acta Neuropathol*; 1993; **85**; 190-8.
- 25.; PUA HL, BISSONNETTE B; Cerebral physiology in paediatric cardiopulmonary bypass; *Can J Anaesth*; 1998; **45**; 960-78.
- 26.; JOHANSSON P, LUNDQVIST C, LINDGREN A, FERENCZ I, ALLING C, STAHL E; Cerebral complications after cardiac surgery assessed by S-100 and NSE levels in blood; *J Cardiothorac Vasc Anesth*; 1995; **9**; 694-9.
- 27.; COOPER WA, DUARTE IG, THOURANI VH, NAKAMURA M, WANG NP, BROWN WM, 3RD, GOTT JP, VINTEN-JOHANSEN J, GUYTON RA; Hypothermic circulatory arrest causes multisystem vascular endothelial dysfunction and apoptosis, discussion 703; *Ann Thorac Surg*; 2000; **69**; 696-702
- 28.; MURKIN JM; The role of CPB management in neurobehavioral outcomes after cardiac surgery; *Ann Thorac Surg*; 1995; **59**; 1308-11.
- 29.; MILLER G, EGGLI KD, CONTANT C, BAYLEN BG, MYERS JL; Postoperative neurologic complications after open heart surgery on young infants; *Arch Pediatr Adolesc Med*; 1995; **149**; 764-8.
- 30.; DU PLESSIS AJ; Mechanisms of brain injury during infant cardiac surgery; *Semin Pediatr Neurol*; 1999; **6**; 32-47.
- 31.; DU PLESSIS AJ; Cerebral hemodynamics and metabolism during infant cardiac surgery Mechanisms of injury and strategies for protection; *J Child Neurol*; 1997; **12**; 285-300.
-

- 32.; MILLER G, VOGEL H; Structural evidence of injury or malformation in the brains of children with congenital heart disease; *Semin Pediatr Neurol*; 1999; **6**; 20-6.
- 33.; FINKELDEY H, MALIG, H.J., STOLTENBURG-DIDINGER, G., SCHUBERT, S., ABDUL-KHALIQ, H., LANGE P.E., PROSENC N; Brain pathology in infants with congenital heart disease In International symposium and the 45 meeting of the german society for neuropathology and neuroanatomy Leipzig, 29.3.-1.4.2000; ; 2000.
- 34.; JONES M; Anomalies of the brain and congenital heart disease a study of 52 necropsy cases; *Pediatr Pathol*; 1991; **11**; 721-36
- 35.; BOKESCH PM, SEIRAFI PA, WARNER KG, MARCHAND JE, KREAM RM, TRAPP B; Differential immediate-early gene expression in ovine brain after cardiopulmonary bypass and hypothermic circulatory arrest; *Anesthesiology*; 1998; **89**; 961-8.
- 36.; WELLS FC, COGHILL S, CAPLAN HL, LINCOLN C; Duration of circulatory arrest does influence the psychological development of children after cardiac operation in early life; *J Thorac Cardiovasc Surg*; 1983; **86**; 823-31.
- 37.; MCLEAN RF, WONG BI, NAYLOR CD, SNOW WG, HARRINGTON EM, GAWEL M, FREMES SE; Cardiopulmonary bypass, temperature, and central nervous system dysfunction; *Circulation*; 1994; **90**; II250-5.
- 38.; SHIN'OKA T, SHUM-TIM D, JONAS RA, LIDOV HG, LAUSSEN PC, MIURA T, DU PLESSIS A; Higher hematocrit improves cerebral outcome after deep hypothermic circulatory arrest discussion 1620-1; *J Thorac Cardiovasc Surg*; 1996; **112**; 1610-20
- 39.; JONAS RA; Hypothermia, circulatory arrest, and the pediatric brain; *J Cardiothorac Vasc Anesth*; 1996; **10**; 66-74.
- 40.; ASHRAF S, BHATTACHARYA K, TIAN Y, WATTERSON K; Cytokine and S100B levels in paediatric patients undergoing corrective cardiac surgery with or without total circulatory arrest; *Eur J Cardiothorac Surg*; 1999; **16**; 32-7.
- 41.; SEGHAIE MC, GRABITZ RG, DUCHATEAU J, BUSSE S, DABRITZ S, KOCH D, ALZEN G, HORNCHEH H, MESSMER BJ, VON BERNUTH G; Inflammatory reaction and capillary leak syndrome related to cardiopulmonary bypass in neonates undergoing cardiac operations; *J Thorac Cardiovasc Surg*; 1996; **112**; 687-97.
-

- 42.; ABDUL-KHALIQ H, BLASIG IE, BAUR MO, HOHLFELD M, ALEXI-MESKHISHVILI V, LANGE PE; Release of the cerebral protein s-100 into blood after reperfusion during cardiac operations in infants is there a relation to oxygen radical-induced lipid peroxidation?; J Thorac Cardiovasc Surg; 1999; **117**; 1027-8.
- 43.; ABDUL-KHALIQ H, SCHUBERT S, STOLTENBURG-DIDINGER G, TROITZSCH D, BOTTCHE W, HUBLER M, MEISSLER M, GROSSE-SIESTROP C, ALEXI-MESKHISHVILI V, HETZER R, LANGE PE; Protein S-100beta in brain and serum after deep hypothermic circulatory arrest in rabbits relationship to perivascular astrocytic swelling; Clin Chem Lab Med; 2000; **38**; 1169-72
- 44.; ASIMAKOPOULOS G; Systemic inflammation and cardiac surgery an update; Perfusion; 2001; **16**; 353-60.
- 45.; BOKESCH PM, MARCHAND J, SEIRAFI PA, DEISS JM, WARNER KG, BRONSON RT, KREAM RM; Immediate-early gene expression in ovine brain after cardiopulmonary bypass and hypothermic circulatory arrest; Anesthesiology; 1996; **85**; 1439-46.
- 46.; BAUMGARTNER WA, WALINSKY PL, SALAZAR JD, TSENG EE, BROCK MV, DOTY JR, REDMOND JM, BLUE ME, GOLDSBOROUGH MA, TRONCOSO JC, JOHNSTON MV; Assessing the impact of cerebral injury after cardiac surgery will determining the mechanism reduce this injury? discussion 1891-4.; Ann Thorac Surg ; 1999; **67**; 1871-3
- 47.; KURTH CD, PRIESTLEY M, GOLDEN J, MCCANN J, RAGHUPATHI R; Regional patterns of neuronal death after deep hypothermic circulatory arrest in newborn pigs; J Thorac Cardiovasc Surg; 1999; **118**; 1068-77.
- 48.; MCLEAN RF, WONG BI; Normothermic versus hypothermic cardiopulmonary bypass central nervous system outcomes quiz 52-3.; J Cardiothorac Vasc Anesth; 1996; **10**; 45-52
- 49.; LANGLEY SM, CHAI PJ, MILLER SE, MAULT JR, JAGGERS JJ, TSUI SS, LODGE AJ, LEFURGEY A, UNGERLEIDER RM; Intermittent perfusion protects the brain during deep hypothermic circulatory arrest discussion 12-3.; Ann Thorac Surg; 1999; **68**; 4-12
- 50.; GRIECO G, D'HOLLOSY M, CULLIFORD AT, JONAS S; Evaluating neuroprotective agents for clinical anti-ischemic benefit using neurological and neuropsychological changes after cardiac surgery under cardiopulmonary bypass Methodological strategies and results of a double-blind, placebo-controlled trial of GM1 ganglioside; Stroke; 1996; **27**; 858-74.
-

- 51.; KERN FH, JONAS RA, MAYER JE, JR., HANLEY FL, CASTANEDA AR, HICKEY PR; Temperature monitoring during CPB in infants does it predict efficient brain cooling?; Ann Thorac Surg; 1992; **54**; 749-54.
- 52.; AOKI M, NOMURA F, STROMSKI ME, TSUJI MK, FACKLER JC, HICKEY PR, HOLTZMAN DH, JONAS RA; Effects of pH on brain energetics after hypothermic circulatory arrest; Ann Thorac Surg; 1993; **55**; 1093-103.
- 53.; JONAS RA, BELLINGER DC, RAPPAPORT LA, WERNOVSKY G, HICKEY PR, FARRELL DM, NEWBURGER JW; Relation of pH strategy and developmental outcome after hypothermic circulatory arrest; J Thorac Cardiovasc Surg; 1993; **106**; 362-8.
- 54.; HIRAMATSU T, MIURA T, FORBESS JM, DU PLESSIS A, AOKI M, NOMURA F, HOLTZMAN D, JONAS RA; pH strategies and cerebral energetics before and after circulatory arrest ,discussion 957-8.; J Thorac Cardiovasc Surg; 1995; **109**; 948-57
- 55.; GREELEY WJ, KERN FH, MELIONES JN, UNGERLEIDER RM; Effect of deep hypothermia and circulatory arrest on cerebral blood flow and metabolism; Ann Thorac Surg; 1993; **56**; 1464-6.
- 56.; O'CONNOR JV, WILDING T, FARMER P, SHER J, ERGIN MA, GRIEPP RB; The protective effect of profound hypothermia on the canine central nervous system during one hour of circulatory arrest; Ann Thorac Surg; 1986; **41**; 255-9.
- 57.; STOLTENBURG-DIDINGER G, ABDUL-KHALIQ H, SCHUBERT S, TROITZSCH D, BÖTTCHER W, WEHSACK A, HETZER R, LANGE PE; Neuroprotective effect of deep hypothermia in a piglet model of circulatory arrest with cardiopulmonary bypass; Brain Pathol; 2000; **10**; 563 A.
- 58.; SEALY WC, BROWN IW, YOUNG WG; A report on the use of both extracorporeal circulation and hypothermia for open heart surgery; Ann Surg; 1958; **147**; 603 - 613.
- 59.; KAWATA H, FACKLER JC, AOKI M, TSUJI MK, SAWATARI K, OFFUTT M, HICKEY PR, HOLTZMAN D, JONAS RA; Recovery of cerebral blood flow and energy state in piglets after hypothermic circulatory arrest versus recovery after low-flow bypass; J Thorac Cardiovasc Surg; 1993; **106**; 671-85.
-

- 60.; MEZROW CK, SADEGHI AM, GANDSAS A, DAPUNT OE, SHIANG HH, ZAPPULLA RA, GRIEPP RB; Cerebral effects of low-flow cardiopulmonary bypass and hypothermic circulatory arrest discussion 539; *Ann Thorac Surg*; 1994; **57**; 532-9
- 61.; SORENSEN HR, HUSUM B, WAABEN J, ANDERSEN K, ANDERSEN LI, GEFKE K, KAARSEN AL, GJEDDE A; Brain microvascular function during cardiopulmonary bypass; *J Thorac Cardiovasc Surg*; 1987; **94**; 727-32.
- 62.; HICKEY PR; Neurologic sequelae associated with deep hypothermic circulatory arrest discussion S69-70, S74-6.; *Ann Thorac Surg*; 1998; **65**; S65-9
- 63.; WATANABE T, MIURA M, INUI K, MINOWA T, SHIMANUKI T, NISHIMURA K, WASHIO M; Blood and brain tissue gaseous strategy for profoundly hypothermic total circulatory arrest; *J Thorac Cardiovasc Surg*; 1991; **102**; 497-504.
- 64.; KIRSHBOM PM, SKARYAK LR, DIBERNARDO LR, KERN FH, GREELEY WJ, GAYNOR JW, UNGERLEIDER RM; pH-stat cooling improves cerebral metabolic recovery after circulatory arrest in a piglet model of aortopulmonary collaterals discussion 156-7.; *J Thorac Cardiovasc Surg*; 1996; **111**; 147-55
- 65.; KURTH CD, O'ROURKE MM, O'HARA IB; Comparison of pH-stat and alpha-stat cardiopulmonary bypass on cerebral oxygenation and blood flow in relation to hypothermic circulatory arrest in piglets [see comments]; *Anesthesiology*; 1998; **89**; 110-8.
- 66.; HINDMAN BJ; Choice of alpha-stat or pH-stat management and neurologic outcomes after cardiac surgery it depends [editorial comment]; *Anesthesiology*; 1998; **89**; 5-7.
- 67.; MIYAMOTO TA, MIYAMOTO KJ; Is alpha-stat management still justified for deep hypothermic circulatory arrest in adults? ; *J Thorac Cardiovasc Surg*; 1999; **118**; 569-70.
- 68.; HINDMAN BJ, DEXTER F, ENOMOTO S, SUBIETA A, SMITH T, CUTKOMP J; Recovery of evoked potential amplitude after cerebral arterial air embolism in the rabbit a comparison of the effect of cardiopulmonary bypass with normal circulation [see comments]; *Anesthesiology*; 1998; **88**; 696-707.
- 69.; GRIEPP RB, ERGIN MA, MCCULLOUGH JN, NGUYEN KH, JUVONEN T, CHANG N, GRIEPP EB; Use of hypothermic circulatory arrest for cerebral protection during aortic surgery; *J Card Surg*; 1997; **12**; 312-21.
-

70.; DEEB GM, WILLIAMS DM, QUINT LE, MONAGHAN HM, SHEA MJ; Risk analysis for aortic surgery using hypothermic circulatory arrest with retrograde cerebral perfusion; *Ann Thorac Surg*; 1999; **67**; 1883-6

discussion 1891-4.; ; ; ; ;

71.; ACIKEL U, UGURLU BS, KARABAY O, SILISTRELI E, OTO O; Retrograde cerebral perfusion with hypothermic circulatory arrest in a child [In Process Citation]; *Ann Thorac Surg*; 2000; **69**; 1243-4.

72.; DEEB GM, JENKINS E, BOLLING SF, BRUNSTING LA, WILLIAMS DM, QUINT LE, DEEB ND; Retrograde cerebral perfusion during hypothermic circulatory arrest reduces neurologic morbidity; *J Thorac Cardiovasc Surg*; 1995; **109**; 259-68.

73.; COSELLI JS; Retrograde cerebral perfusion is an effective means of neural support during deep hypothermic circulatory arrest [see comments]; *Ann Thorac Surg*; 1997; **64**; 908-12.

74.; YE J, YANG L, DEL BIGIO MR, SUMMERS R, SALERNO TA, DESLAURIERS R; The effect of circulatory arrest and retrograde cerebral perfusion on microtubule-associated protein 2 an immunohistochemical study in pig hippocampus; *Neurosci Lett*; 1997; **222**; 9-12.

75.; WONG CH, BONSER RS; Does retrograde cerebral perfusion affect risk factors for stroke and mortality after hypothermic circulatory arrest? discussion 1919-21.; *Ann Thorac Surg*; 1999; **67**; 1900-3

76.; GRIEPP RB, JUVONEN T, GRIEPP EB, MCCOLLOUGH JN, ERGIN MA; Is retrograde cerebral perfusion an effective means of neural support during deep hypothermic circulatory arrest? ; *Ann Thorac Surg*; 1997; **64**; 913-6.

77.; YE J, YANG L, DEL BIGIO MR, FILGUEIRAS CL, EDE M, SUMMERS R, SALERNO TA, DESLAURIERS R; Neuronal damage after hypothermic circulatory arrest and retrograde cerebral perfusion in the pig; *Ann Thorac Surg*; 1996; **61**; 1316-22.

78.; NAIK SK, KNIGHT A, ELLIOTT MJ; A successful modification of ultrafiltration for cardiopulmonary bypass in children; *Perfusion*; 1991; **6**; 41-50.

79.; NAIK SK, KNIGHT A, ELLIOTT M; A prospective randomized study of a modified technique of ultrafiltration during pediatric open-heart surgery; *Circulation*; 1991; **84**; III422-31.

- 80.; SKARYAK LA, KIRSHBOM PM, DIBERNARDO LR, KERN FH, GREELEY WJ, UNGERLEIDER RM, GAYNOR JW; Modified ultrafiltration improves cerebral metabolic recovery after circulatory arrest discussion 751-2.; J Thorac Cardiovasc Surg; 1995; **109**; 744-51
- 81.; SHIN'OKA T, SHUM-TIM D, LAUSSEN PC, ZINKOVSKY SM, LIDOV HG, DU PLESSIS A, JONAS RA; Effects of oncotic pressure and hematocrit on outcome after hypothermic circulatory arrest; Ann Thorac Surg; 1998; **65**; 155-64.
- 82.; WATANABE T, MIURA M, ORITA H, KOBAYASI M, WASHIO M; Brain tissue pH, oxygen tension, and carbon dioxide tension in profoundly hypothermic cardiopulmonary bypass Pulsatile assistance for circulatory arrest, low-flow perfusion, and moderate-flow perfusion; J Thorac Cardiovasc Surg; 1990; **100**; 274-80.
- 83.; UNДАР A, HENDERSON N, THURSTON GB, MASAI T, BEYER EA, FRAZIER OH, FRASER CD, JR; The effects of pulsatile versus nonpulsatile perfusion on blood viscoelasticity before and after deep hypothermic circulatory arrest in a neonatal piglet model; Artif Organs; 1999; **23**; 717-21.
- 84.; LODGE AJ, UNДАР A, DAGGETT CW, RUNGE TM, CALHOON JH, UNGERLEIDER RM; Regional blood flow during pulsatile cardiopulmonary bypass and after circulatory arrest in an infant model; Ann Thorac Surg; 1997; **63**; 1243-50.
- 85.; CHOW G, ROBERTS IG, EDWARDS AD, LLOYD-THOMAS A, WADE A, ELLIOTT MJ, KIRKHAM FJ; The relation between pump flow rate and pulsatility on cerebral hemodynamics during pediatric cardiopulmonary bypass [see comments]; J Thorac Cardiovasc Surg; 1997; **114**; 568-77.
- 86.; WILLIAMS GD, SEIFEN AB, LAWSON NW, NORTON JB, READINGER RI, DUNGAN TW, CALLAWAY JK, CAMPBELL GS; Pulsatile perfusion versus conventional high-flow nonpulsatile perfusion for rapid core cooling and rewarming of infants for circulatory arrest in cardiac operation; J Thorac Cardiovasc Surg; 1979; **78**; 667-77.
- 87.; UNДАР A, MASAI T, YANG SQ, GODDARD-FINEGOLD J, FRAZIER OH, FRASER CD, JR; Effects of perfusion mode on regional and global organ blood flow in a neonatal piglet model discussion 1342-3.; Ann Thorac Surg; 1999; **68**; 1336-42
- 88.; BUSTO R, DIETRICH WD, GLOBUS MY, GINSBERG MD; The importance of brain temperature in cerebral ischemic injury; Stroke; 1989; **20**; 1113-4.
-

- 89.; MUJSCE DJ, TOWFIGHI J, HEITJAN DF, VANNUCCI RC; Differences in intraschemic temperature influence neurological outcome after deep hypothermic circulatory arrest in newborn dogs discussion 1442; *Stroke*; 1994; **25**; 1433-41
- 90.; GELMAN B, SCHLEIEN CL, LOHE A, KULUZ JW; Selective brain cooling in infant piglets after cardiac arrest and resuscitation; *Crit Care Med*; 1996; **24**; 1009-17.
- 91.; SHUM-TIM D, NAGASHIMA M, SHINOKA T, BUCERIUS J, NOLLERT G, LIDOV HG, DU PLESSIS A, LAUSSEN PC, JONAS RA; Postischemic hyperthermia exacerbates neurologic injury after deep hypothermic circulatory arrest; *J Thorac Cardiovasc Surg*; 1998; **116**; 780-92.
- 92.; WASS CT, WAGGONER JR, 3RD, CABLE DG, SCHAFF HV, SCHROEDER DR, LANIER WL; Selective convective brain cooling during hypothermic cardiopulmonary bypass in dogs; *Ann Thorac Surg*; 1998; **66**; 2008-14.
- 93.; LANGLEY SM, CHAI PJ, JAGGERS JJ, UNGERLEIDER RM; Preoperative high dose methylprednisolone attenuates the cerebral response to deep hypothermic circulatory arrest; *Eur J Cardiothorac Surg*; 2000; **17**; 279-86.
- 94.; SHIN'OKA T, NAGASHIMA M, NOLLERT G, SHUM-TIM D, LAUSSEN PC, LIDOV HG, DU PLESSIS A, JONAS RA; A novel sialyl Lewis X analog attenuates cerebral injury after deep hypothermic circulatory arrest; *J Thorac Cardiovasc Surg*; 1999; **117**; 1204-11.
- 95.; TSUI SS, KIRSHBOM PM, DAVIES MJ, JACOBS MT, KERN FH, GAYNOR JW, GREELEY WJ, UNGERLEIDER RM; Thromboxane A2-receptor blockade improves cerebral protection for deep hypothermic circulatory arrest; *Eur J Cardiothorac Surg*; 1997; **12**; 228-35.
- 96.; EHRLICH M, KNOLLE E, CIOVICA R, BOCK P, TURKOF E, GRABENWOGER M, CARTES-ZUMELZU F, KOCHER A, POCKBERGER H, FANG WC, WOLNER E, HAVEL M; Memantine for prevention of spinal cord injury in a rabbit model; *J Thorac Cardiovasc Surg*; 1999; **117**; 285-91.
- 97.; LANG-LAZDUNSKI L, HEURTEAUX C, VAILLANT N, WIDMANN C, LAZDUNSKI M; Riluzole prevents ischemic spinal cord injury caused by aortic crossclamping; *J Thorac Cardiovasc Surg*; 1999; **117**; 881-9.
- 98.; AOKI M, NOMURA F, STROMSKI ME, TSUJI MK, FACKLER JC, HICKEY PR, HOLTZMAN D, JONAS RA; Effects of MK-801 and NBQX on acute recovery of piglet cerebral metabolism after hypothermic circulatory arrest; *J Cereb Blood Flow Metab*; 1994; **14**; 156-65.
-

- 99.; BELBOUL A, ROBERTS D, BORJESSON R, JOHNSON J; Oxygen free radical generation in healthy blood donors and cardiac patients the protective effect of allopurinol; *Perfusion*; 2001; **16**; 59-65
- 100.; BARTA E, PECHAN I, CORNAK V, LUKNAROVA O, RENDEKOVA V, VERCHOVODKO P; Protective effect of alpha-tocopherol and L-ascorbic acid against the ischemic-reperfusion injury in patients during open-heart surgery; *Bratisl Lek Listy*; 1991; **92**; 174-83.
- 101.; HIRAMATSU T, JONAS RA, MIURA T, DUPLESSIS A, TANJI M, FORBESS JM, HOLTZMAN D; Cerebral metabolic recovery from deep hypothermic circulatory arrest after treatment with arginine and nitro-arginine methyl ester; *J Thorac Cardiovasc Surg*; 1996; **112**; 698-707.
- 102.; GOVAERT P, DE VRIES, LS; *An Atlas of Neonatal Brain Sonography Clinics in Developmental Medicine*; ; 1997.; London McKeith Press
- 103.; BRANN BS, WOFSY, C., WICKS, J., BRAYER, J.; The quantitation of neonatal cerebral ventricular volume by real time ultrasonography derivation and in vitro confirmation of mathematical model; *Journal of Ultrasound in Medicine*; 1989; **9**; 1-8.
- 104.; ABDUL-KHALIQ H, VOGEL M, EWERT P, NAGDYMAN N, LANGE PE; Erste klinische Erfahrungen mit dreidimensionalem Ultraschall des Gehirns bei Neugeborenen; *Monatsschr Kinderheilkd*; 1997; **145**; 1071-75.
- 105.; ABDUL-KHALIQ H, VOGEL M, EWERT P, NAGDYMAN N, UHLEMANN F, LANGE PE; Initial experience with three-dimensional reconstruction of the brain using transfontanelle ultrasound in infants following cardiac surgery; *Pediatr Res*; 1996; **39**; 189A.
- 106.; VAN HOUTEN JP, ROTHMAN A, BEJAR R; High incidence of cranial ultrasound abnormalities in full-term infants with congenital heart disease; *Am J Perinatol*; 1996; **13**; 47-53.
- 107.; SIGLER M, VAZQUEZ-JIMENEZ JF, GRABITZ RG, HOVELS-GURICH HH, MESSMER BJ, VON BERNUTH G, SEGHAIE MC; Time course of cranial ultrasound abnormalities after arterial switch operation in neonates; *Ann Thorac Surg*; 2001; **71**; 877-80.
- 108.; VOGEL M, HO SY, BUHLMAYER K, ANDERSON RH; Assessment of congenital heart defects by dynamic three-dimensional echocardiography methods of data acquisition and clinical potential; *Acta Paediatr Suppl*; 1995; **410**; 34-9.
-

- 109.; ABDUL-KHALIQ H, LANGE PE, VOGEL M; Feasibility of brain volumetric analysis and reconstruction of images by transfontanel three-dimensional ultrasound; J Neuroimaging; 2000; **10**; 147-50.
- 110.; BOZOKY B, BARA D, KERTESZ E; Autopsy study of cerebral complications of congenital heart disease and cardiac surgery; J Neurol; 1984; **231**; 153-61.
- 111.; TERPLAN KL; Brain changes in newborns, infants and children with congenital heart disease in association with cardiac surgery Additional observations; J Neurol; 1976; **212**; 225-36.
- 112.; COLEMAN EN; Brain damage from congenital heart disease; Dev Med Child Neurol; 1973; **15**; 819-21.
- 113.; YANG SY; Brain abscess associated with congenital heart disease; Surg Neurol; 1989; **31**; 129-32.
- 114.; GUERIN P, DOS SANTOS P, JIMENEZ M, DUMAS DE LA ROQUE E, LABBE L, SOLELHAC B, SROUR S, CHOSSAT A; [Cerebral abscess and cyanotic congenital heart disease]; Arch Mal Coeur Vaiss; 1997; **90**; 651-4.
- 115.; BELLINGER DC, WERNOVSKY G, RAPPAPORT LA, MAYER JE, JR., CASTANEDA AR, FARRELL DM, WESSEL DL, LANG P, HICKEY PR, JONAS RA, ET AL; Cognitive development of children following early repair of transposition of the great arteries using deep hypothermic circulatory arrest; Pediatrics; 1991; **87**; 701-7.
- 116.; RENNER G, FRICKE, T.; Der Hamburg-Wechsler-Intelligenztest für Kinder; Report Psychologie; 2001; **26**; 1-7.
- 117.; ASTUDILLO R, VAN DER LINDEN J, EKROTH R, WESSLEN O, HALLHAGEN S, SCALLAN M, SHORE D, LINCOLN C; Absent diastolic cerebral blood flow velocity after circulatory arrest but not after low flow in infants; Ann Thorac Surg; 1993; **56**; 515-9.
- 118.; BURROWS FA; Transcranial Doppler monitoring of cerebral perfusion during cardiopulmonary bypass; Ann Thorac Surg; 1993; **56**; 1482-4.
- 119.; BURROWS FA, BISSONNETTE B; Cerebral blood flow velocity patterns during cardiac surgery utilizing profound hypothermia with low-flow cardiopulmonary bypass or circulatory arrest in neonates and infants [see comments]; Can J Anaesth; 1993; **40**; 298-307.
-

- 120.; KURTH CD, STEVEN JM, NICOLSON SC; Cerebral oxygenation during pediatric cardiac surgery using deep hypothermic circulatory arrest; *Anesthesiology*; 1995; **82**; 74-82.
- 121.; KURTH CD, STEVEN JM, NICOLSON SC, CHANCE B, DELIVORIA-PAPADOPOULOS M; Kinetics of cerebral deoxygenation during deep hypothermic circulatory arrest in neonates; *Anesthesiology*; 1992; **77**; 656-61.
- 122.; NOLLERT G, NAGASHIMA M, BUCERIUS J, SHIN'OKA T, LIDOV HG, DU PLESSIS A, JONAS RA; Oxygenation strategy and neurologic damage after deep hypothermic circulatory arrest II hypoxic versus free radical injury; *J Thorac Cardiovasc Surg*; 1999; **117**; 1172-9.
- 123.; NOLLERT G, SHIN'OKA T, JONAS RA; Near-infrared spectrophotometry of the brain in cardiovascular surgery; *Thorac Cardiovasc Surg*; 1998; **46**; 167-75.
- 124.; DU PLESSIS AJ, NEWBURGER J, JONAS RA, HICKEY P, NARUSE H, TSUJI M, WALSH A, WALTER G, WYPIJ D, VOLPE JJ; Cerebral oxygen supply and utilization during infant cardiac surgery; *Ann Neurol*; 1995; **37**; 488-97.
- 125.; DU PLESSIS AJ, NEWBURGER J, HICKEY P, JONAS RA, VOLPE JJ; Cerebral oxygenation during hypothermic cardiopulmonary bypass clinical findings support mathematical model; *Anesthesiology*; 1996; **84**; 1008-9.
- 126.; BURROWS FA, BISSONNETTE B; Monitoring the adequacy of cerebral perfusion during cardiopulmonary bypass in children using transcranial Doppler technology; *J Neurosurg Anesthesiol*; 1993; **5**; 209-12.
- 127.; NUTTALL GA, COOK DJ, FULGHAM JR, OLIVER WC, JR., PROPER JA; The relationship between cerebral blood flow and transcranial Doppler blood flow velocity during hypothermic cardiopulmonary bypass in adults; *Anesth Analg*; 1996; **82**; 1146-51.
- 128.; NUTTALL GA, COOK DJ; Transcranial Doppler sonography and cerebral blood flow during cardiopulmonary bypass; *Ann Thorac Surg*; 1997; **64**; 891-2.
- 129.; WEYLAND A, STEPHAN H, KAZMAIER S, WEYLAND W, SCHORN B, GRUNE F, SONNTAG H; Flow velocity measurements as an index of cerebral blood flow Validity of transcranial Doppler sonographic monitoring during cardiac surgery; *Anesthesiology*; 1994; **81**; 1401-10
-

130.; JONASSEN AE, QUAEGEBEUR JM, YOUNG WL; Cerebral blood flow velocity in pediatric patients is reduced after cardiopulmonary bypass with profound hypothermia; J Thorac Cardiovasc Surg; 1995; **110**; 934-43.

131.; ABDUL-KHALIQ H, UHLIG R, BOTTCHE W, EWERT P, ALEXI-MESKISHIVILLI V, LANGE PE; Factors influencing the change in cerebral hemodynamics in pediatric patients during and after corrective cardiac surgery of congenital heart diseases by means of full flow cardiopulmonary bypass; Perfusion (Im Druck); 2002.; ;

132.; ABDUL-KHALIQ H, TROITZSCH D, VOGT S, ALEXI-MESKHISHVILLI V, LANGE PE; Neurozerebrales Monitoring bei Korrekturoperationen angeborener Herzfehler mit extrakorporaler Zirkulation im Säuglings- und Kindesalter In; Extrakorporale Zirkulation in der Theorie und Praxis; 1999; Papst Science Publischers Tschaud R, ed; Lengerich, Berlin, Düsseldorf, Leipzig, Riga, Scottsdale AZ (USA), Wien, Zagreb;648-671

133.; BODE H, EDEN A; Transcranial Doppler sonography in children; J Child Neurol; 1989; **4**; S68-76.

134.; ESMAILIAN F, DOX H, SADEGHI A, EGHBALI K, LAKS H; Retrograde cerebral perfusion as an adjunct to prolonged hypothermic circulatory arrest; Chest; 1999; **116**; 887-91.

135.; HILLIER SC, BURROWS FA, BISSONNETTE B, TAYLOR RH; Cerebral hemodynamics in neonates and infants undergoing cardiopulmonary bypass and profound hypothermic circulatory arrest assessment by transcranial Doppler sonography; Anesth Analg; 1991; **72**; 723-8.

136.; O'HARE B, BISSONNETTE B, BOHN D, COX P, WILLIAMS W; Persistent low cerebral blood flow velocity following profound hypothermic circulatory arrest in infants; Can J Anaesth; 1995; **42**; 964-71.

137.; JOBSIS FF; Noninvasive, infrared monitoring of cerebral and myocardial oxygen sufficiency and circulatory parameters; Science; 1977; **198**; 1264-7.

138.; ABDUL-KHALIQ H, SCHUBERT S, TROITZSCH D, HUEBLER M, BOETTCHER W, BAUR MO, LANGE PE; Dynamic changes in cerebral oxygenation related to deep hypothermia and circulatory arrest evaluated by near-infrared spectroscopy; Acta Anaesthesiol Scand; 2001; **45**; 696-701.

139.; ABDUL-KHALIQ H, TROITZSCH D, BERGER F, LANGE PE; [Regional transcranial oximetry with near infrared spectroscopy (NIRS) in comparison with measuring oxygen saturation

in the jugular bulb in infants and children for monitoring cerebral oxygenation]; Biomed Tech (Berl); 2000; **45**; 328-32.

140.; COOPER CE, DELPY DT, NEMOTO EM; The relationship of oxygen delivery to absolute haemoglobin oxygenation and mitochondrial cytochrome oxidase redox state in the adult brain a near-infrared spectroscopy study; Biochem J; 1998; **332**; 627-32.

141.; COOPER CE, COPE M, SPRINGETT R, AMESS PN, PENRICE J, TYSZCZUK L, PUNWANI S, ORDIDGE R, WYATT J, DELPY DT; Use of mitochondrial inhibitors to demonstrate that cytochrome oxidase near-infrared spectroscopy can measure mitochondrial dysfunction noninvasively in the brain; J Cereb Blood Flow Metab; 1999; **19**; 27-38.

142.; COOPER CE, COPE M, QUARESIMA V, FERRARI M, NEMOTO E, SPRINGETT R, MATCHER S, AMESS P, PENRICE J, TYSZCZUK L, WYATT J, DELPY DT; Measurement of cytochrome oxidase redox state by near infrared spectroscopy; Adv Exp Med Biol; 1997; **413**; 63-73.

143.; COOPER CE, MATCHER SJ, WYATT JS, COPE M, BROWN GC, NEMOTO EM, DELPY DT; Near-infrared spectroscopy of the brain relevance to cytochrome oxidase bioenergetics; Biochem Soc Trans; 1994; **22**; 974-80

144.; TSUJI M, NARUSE H, VOLPE J, HOLTZMAN D; Reduction of cytochrome aa3 measured by near-infrared spectroscopy predicts cerebral energy loss in hypoxic piglets; Pediatr Res; 1995; **37**; 253-9.

145.; NOMURA F, NARUSE H, DUPLESSIS A, HIRAMATSU T, FORBESS J, HOLTZMAN D, VOLPE JJ, JONAS R, TSUJI M; Cerebral oxygenation measured by near infrared spectroscopy during cardiopulmonary bypass and deep hypothermic circulatory arrest in piglets; Pediatr Res; 1996; **40**; 790-6.

146.; WYATT JS; Noninvasive assessment of cerebral oxidative metabolism in the human newborn; J R Coll Physicians Lond; 1994; **28**; 126-32.

147.; DELPY DT, COPE MC, CADY EB, WYATT JS, HAMILTON PA, HOPE PL, WRAY S, REYNOLDS EO; Cerebral monitoring in newborn infants by magnetic resonance and near infrared spectroscopy; Scand J Clin Lab Invest Suppl; 1987; **188**; 9-17.

148.; WAHR JA, TREMPER KK, SAMRA S, DELPY DT; Near-infrared spectroscopy theory and applications; J Cardiothorac Vasc Anesth; 1996; **10**; 406-18.

- 149.; MATSUMOTO H, ODA T, HOSSAIN MA, YOSHIMURA N; Does the redox state of cytochrome aa3 reflect brain energy level during hypoxia? Simultaneous measurements by near infrared spectrophotometry and ³¹P nuclear magnetic resonance spectroscopy; *Anesth Analg*; 1996; **83**; 513-8.
- 150.; COOPER C, SHARPE M, ELWELL C, SPRINGETT R, PENRICE J, TYSZCZUK L, AMESS P, WYATT J, QUARESIMA V, DELPY D; The cytochrome oxidase redox state in vivo; *Adv Exp Med Biol*; 1997; **428**; 449-56.
- 151.; SPRINGETT R, NEWMAN J, COPE M, DELPY DT; Oxygen dependency and precision of cytochrome oxidase signal from full spectral NIRS of the piglet brain; *Am J Physiol Heart Circ Physiol*; 2000; **279**; H2202-9.
- 152.; FIRBANK M, ELWELL CE, COOPER CE, DELPY DT; Experimental and theoretical comparison of NIR spectroscopy measurements of cerebral hemoglobin changes; *J Appl Physiol*; 1998; **85**; 1915-21.
- 153.; LASSNIGG A, HIESMAYR M, KEZNICKL P, MULLNER T, EHRLICH M, GRUBHOFFER G; Cerebral oxygenation during cardiopulmonary bypass measured by near-infrared spectroscopy effects of hemodilution, temperature, and flow; *J Cardiothorac Vasc Anesth*; 1999; **13**; 544-8.
- 154.; ZIMMER DB, CORNWALL EH, LANDAR A, SONG W; The S100 protein family history, function, and expression; *Brain Res Bull*; 1995; **37**; 417-29.
- 155.; SCHAFER BW, HEIZMANN CW; The S100 family of EF-hand calcium-binding proteins functions and pathology; *Trends Biochem Sci*; 1996; **21**; 134-40
- 156.; MOORE BW; A soluble protein characteristic of the nervous system; *Biochem Biophys Res Commun*; 1965; **19**; 739-44.
- 157.; ZIMMER DB, DUBUISSON JG; Identification of an S100 target protein glycogen phosphorylase; *Cell Calcium*; 1993; **14**; 323-32.
- 158.; VAN ELDIK LJ, EHRENFRIED B, JENSEN RA; Production and characterization of monoclonal antibodies with specificity for the S100 beta polypeptide of brain S100 fractions; *Proc Natl Acad Sci U S A*; 1984; **81**; 6034-8.
- 159.; VAN ELDIK LJ, JENSEN RA, EHRENFRIED BA, WHETSELL WO, JR; Immunohistochemical localization of S100 beta in human nervous system tumors by using
-

monoclonal antibodies with specificity for the S100 beta polypeptide; *J Histochem Cytochem*; 1986; **34**; 977-82.

160.; DYCK RH, VAN ELDIK LJ, CYNADER MS; Immunohistochemical localization of the S-100 beta protein in postnatal cat visual cortex spatial and temporal patterns of expression in cortical and subcortical glia; *Brain Res Dev Brain Res*; 1993; **72**; 181-92.

161.; DONATO R; Chlorpromazine inhibits the calcium-mediated effects of S-100 protein(s) on assembled brain microtubule proteins, but not those on microtubule protein assembly; *Biochem Biophys Res Commun*; 1984; **122**; 983-90.

162.; DONATO R; Mechanism of action of S-100 protein(s) on brain microtubule protein assembly; *Biochem Biophys Res Commun*; 1984; **124**; 850-6.

163.; BAUDIER J, GLASSER N, GERARD D; Ions binding to S100 proteins I Calcium- and zinc-binding properties of bovine brain S100 alpha alpha, S100a (alpha beta), and S100b (beta beta) protein Zn²⁺ regulates Ca²⁺ binding on S100b protein; *J Biol Chem*; 1986; **261**; 8192-203.

164.; HEIZMANN CW; Ca²⁺-binding S100 proteins in the central nervous system; *Neurochem Res*; 1999; **24**; 1097-100.

165.; FANO G, MARIGGIO MA, ANGELELLA P, NICOLETTI I, ANTONICA A, FULLE S, CALISSANO P; The S-100 protein causes an increase of intracellular calcium and death of PC12 cells; *Neuroscience*; 1993; **53**; 919-25.

166.; HU J, CASTETS F, GUEVARA JL, VAN ELDIK LJ; S100 beta stimulates inducible nitric oxide synthase activity and mRNA levels in rat cortical astrocytes; *J Biol Chem*; 1996; **271**; 2543-7.

167.; HU J, VAN ELDIK LJ; S100 beta induces apoptotic cell death in cultured astrocytes via a nitric oxide-dependent pathway; *Biochim Biophys Acta*; 1996; **1313**; 239-45.

168.; HU J, FERREIRA A, VAN ELDIK LJ; S100beta induces neuronal cell death through nitric oxide release from astrocytes; *J Neurochem*; 1997; **69**; 2294-301.

169.; ROTHERMUNDT M, MISSLER U, AROLT V, PETERS M, LEADBEATER J, WIESMANN M, RUDOLF S, WANDINGER KP, KIRCHNER H; Increased S100B blood levels in unmedicated and treated schizophrenic patients are correlated with negative symptomatology; *Mol Psychiatry*; 2001; **6**; 445-9.

- 170.; MARSHAK DR, PESCE SA, STANLEY LC, GRIFFIN WS; Increased S100 beta neurotrophic activity in Alzheimer's disease temporal lobe; *Neurobiol Aging*; 1992; **13**; 1-7.
- 171.; ABRAHA HD, NOBLE PL, NICOLAIDES KH, SHERWOOD RA; Maternal serum S100 protein in normal and Down syndrome pregnancies; *Prenat Diagn*; 1999; **19**; 334-6.
- 172.; STEINHOFF BJ, TUMANI H, OTTO M, MURSCH K, WILTFANG J, HERRENDORF G, BITTERMANN HJ, FELGENHAUER K, PAULUS W, MARKAKIS E; Cisternal S100 protein and neuron-specific enolase are elevated and site-specific markers in intractable temporal lobe epilepsy; *Epilepsy Res*; 1999; **36**; 75-82.
- 173.; OTTO M, WILTFANG J, SCHUTZ E, ZERR I, OTTO A, PFAHLBERG A, GEFELLER O, UHR M, GIESE A, WEBER T, KRETZSCHMAR HA, POSER S; Diagnosis of Creutzfeldt-Jakob disease by measurement of S100 protein in serum prospective case-control study; *Bmj*; 1998; **316**; 577-82.
- 174.; EMEIS M, ABDUL-KHALIQ, H., STOLTENBURG-DIDINGER, G., LANGE PE, ROSSI, R; Protein S-100B and Neurospecific Enolase (NSE) in serum and cerebrospinal fluid in children with bacterial meningitis and other neurological disorders; *Neuropediatrics* (in review); 2002.; ;
- 175.; OTTO M, BAHN E, WILTFANG J, BOEKHOFF I, BEUCHE W; Decrease of S100 beta protein in serum of patients with amyotrophic lateral sclerosis; *Neurosci Lett*; 1998; **240**; 171-3.
- 176.; ABDUL-KHALIQ H, WEIPERT TH, UHLIG R, PEETERS B, ALEXI-MESKISHVILI V, FELIX R, KUPPE H, HETZER R, LANGE PE; Das Serum S-100 Protein nach Korrekturoperationen angeborener Herzfehler im Kleinkindesalter Beziehung zur Veränderungen der intraoperativen zerebralen Oxygenierung; *Intensivmed*; 2000; **37**; 1-8.
- 177.; ABDUL-KHALIQ H, SCHUBERT S, RÜTZLER K, UHLIG R, DITTRICH H, ALEXI-MESKISHIVILLI V, LANGE PE; Normal and abnormal serum levels of Protein S-100B in Serum after corrective cardiac surgery; *Crit Care Med*, accepted; 2002; **Cr.**;
- 178.; SHAABAN ALI M, HARMER M, VAUGHAN RS, DUNNE J, LATTO IP; Early release pattern of S100 protein as a marker of brain damage after warm cardiopulmonary bypass; *Anaesthesia*; 2000; **55**; 802-6.
- 179.; RASMUSSEN LS, CHRISTIANSEN M, HANSEN PB, MOLLER JT; Do blood levels of neuron-specific enolase and S-100 protein reflect cognitive dysfunction after coronary artery bypass? ; *Acta Anaesthesiol Scand*; 1999; **43**; 495-500.
-

- 180.; HERRMANN M, CURIO N, JOST S, GRUBICH C, EBERT AD, FORK ML, SYNOWITZ H; Release of biochemical markers of damage to neuronal and glial brain tissue is associated with short and long term neuropsychological outcome after traumatic brain injury; J Neurol Neurosurg Psychiatry; 2001; **70**; 95-100.
- 181.; HERRMANN M, EBERT AD, GALAZKY I, WUNDERLICH MT, KUNZ WS, HUTH C; Neurobehavioral outcome prediction after cardiac surgery role of neurobiochemical markers of damage to neuronal and glial brain tissue; Stroke; 2000; **31**; 645-50.
- 182.; ANDERSON RE, HANSSON LO, LISKI J, SETTERGREN G, VAAGE J; The effect of cardiectomy suction on the brain injury marker S100beta after cardiopulmonary bypass; Ann Thorac Surg; 2000; **69**; 847-50.
- 183.; JONSSON H, JOHNSON P, HOGLUND P, ALLING C, BLOMQUIST S; Elimination of S100B and renal function after cardiac surgery; J Cardiothorac Vasc Anesth; 2000; **14**; 698-701.
- 184.; JONSSON H, JOHNSON P, ALLING C, WESTABY S, BLOMQUIST S; Significance of serum S100 release after coronary artery bypass grafting; Ann Thorac Surg; 1998; **65**; 1639-44.
- 185.; ABDUL-KHALIQ H, WEIPERT T, ALEXI-MESKISHVILI V, KUPPE H, HETZER R, LANGE PE; Perioperative Überwachung der zerebralen Oxygenierung mit Hilfe der Nahinfrarotspektroskopie in der pädiatrischen Herzchirurgie; Z Herz Thorax Gefäßchir; 1998; **12**; 65-72.
- 186.; NOLLERT G, NAGASHIMA M, BUCERIUS J, SHIN'OKA T, JONAS RA; Oxygenation strategy and neurologic damage after deep hypothermic circulatory arrest I Gaseous microemboli; J Thorac Cardiovasc Surg; 1999; **117**; 1166-71.
- 187.; PYLES LA, FORTNEY JE, KUDLAK JJ, GUSTAFSON RA, EINZIG S; Plasma antioxidant depletion after cardiopulmonary bypass in operations for congenital heart disease; J Thorac Cardiovasc Surg; 1995; **110**; 165-71.
- 188.; MCCOLL AJ, KEEBLE T, HADJINIKOLAOU L, COHEN A, AITKENHEAD H, GLENVILLE B, RICHMOND W; Plasma antioxidants evidence for a protective role against reactive oxygen species following cardiac surgery; Ann Clin Biochem; 1998; **35**; 616-23.
- 189.; MORITA K, IHNKEN K, BUCKBERG GD, IGNARRO LJ; Oxidative insult associated with hyperoxic cardiopulmonary bypass in the infantile heart and lung; Jpn Circ J; 1996; **60**; 355-63.
-

- 190.; WEINBROUM AA, HOCHHAUSER E, RUDICK V, KLUGER Y, KARCHEVSKY E, GRAF E, VIDNE BA; Multiple organ dysfunction after remote circulatory arrest; common pathway of radical oxygen species? *J Trauma*; 1999; **47**; 691-8.
- 191.; CHANG J, RAO NV, MARKEWITZ BA, HOIDAL JR, MICHAEL JR; Nitric oxide donor prevents hydrogen peroxide-mediated endothelial cell injury; *Am J Physiol*; 1996; **270**; L931-40.
- 192.; MOHANAKUMAR KP, HANBAUER I, CHIUEH CC; Neuroprotection by nitric oxide against hydroxyl radical-induced nigral neurotoxicity; *J Chem Neuroanat*; 1998; **14**; 195-205.
- 193.; BLASIG IE, GIESE H, SCHROETER ML, SPORBERT A, UTEPBERGENOV DI, BUCHWALOW IB, NEUBERT K, SCHONFELDER G, FREYER D, SCHIMKE I, SIEMS WE, PAUL M, HASELOFF RF, BLASIG R; *No and oxyradical metabolism in new cell lines of rat brain capillary endothelial cells forming the blood-brain barrier; *Microvasc Res*; 2001; **62**; 114-27.
- 194.; SCHROETER ML, MERTSCH K, GIESE H, MULLER S, SPORBERT A, HICKEL B, BLASIG IE; Astrocytes enhance radical defence in capillary endothelial cells constituting the blood-brain barrier; *FEBS Lett*; 1999; **449**; 241-4.
- 195.; UTEPBERGENOV DI, MERTSCH K, SPORBERT A, TENZ K, PAUL M, HASELOFF RF, BLASIG IE; Nitric oxide protects blood-brain barrier in vitro from hypoxia/reoxygenation-mediated injury; *FEBS Lett*; 1998; **424**; 197-201.
- 196.; BLASIG IE, SPORBERT A, UTEPBERGENOV DI, SCHROETER ML, MERTSCH K, HASELOFF RF; Cytokine- and hypoxia-induced lipid peroxidation in astrocytes; *Int J Clin Pharmacol Ther*; 1998; **36**; 112-3.
- 197.; ABDUL-KHALIQ H, SCHUBERT S, FISCHER T, BOTTCHER W, HARKE C, ALEXI-MESKISHVILI V, LANGE PE, BLASIG IE; The effect of continuous treatment with sodium nitroprusside on the serum kinetics of the brain marker protein S-100beta in neonates undergoing corrective cardiac surgery by means of hypothermic cardiopulmonary bypass; *Clin Chem Lab Med*; 2000; **38**; 1173-5.
- 198.; THOMPSON LD, MCELHINNEY DB, FINDLAY P, MILLER-HANCE W, CHEN MJ, MINAMI M, PETROSSIAN E, PARRY AJ, REDDY VM, HANLEY FL; A prospective randomized study comparing volume-standardized modified and conventional ultrafiltration in pediatric cardiac surgery; *J Thorac Cardiovasc Surg*; 2001; **122**; 220-8.
-

- 199.; PEARL JM, MANNING PB, MCNAMARA JL, SAUCIER MM, THOMAS DW; Effect of modified ultrafiltration on plasma thromboxane B₂, leukotriene B₄, and endothelin-1 in infants undergoing cardiopulmonary bypass; *Ann Thorac Surg*; 1999; **68**; 1369-75.
- 200.; BANDO K, TURRENTINE MW, VIJAY P, SHARP TG, SEKINE Y, LALONE BJ, SZEKELY L, BROWN JW; Effect of modified ultrafiltration in high-risk patients undergoing operations for congenital heart disease discussion 828.; *Ann Thorac Surg*; 1998; **66**; 821-7
- 201.; CHATURVEDI RR, SHORE DF, WHITE PA, SCALLAN MH, GOTHARD JW, REDINGTON AN, LINCOLN C; Modified ultrafiltration improves global left ventricular systolic function after open-heart surgery in infants and children; *Eur J Cardiothorac Surg*; 1999; **15**; 742-6.
- 202.; GAYNOR JW; Use of modified ultrafiltration after repair of congenital heart defects; *Semin Thorac Cardiovasc Surg Pediatr Card Surg Annu*; 1998; **1**; 81-90.
- 203.; KAMEYAMA T, ANDO F, OKAMOTO F, HANADA M, YAMANAKA K, SASAHASHI N, HIROSE K, MATSUNO S, MATSUURA S; The effect of modified ultrafiltration in pediatric open heart surgery; *Ann Thorac Cardiovasc Surg*; 2000; **6**; 19-26.
- 204.; GRUNENFELDER J, ZUND G, SCHOEBERLEIN A, MALY FE, SCHURR U, GUNTLI S, FISCHER K, TURINA M; Modified ultrafiltration lowers adhesion molecule and cytokine levels after cardiopulmonary bypass without clinical relevance in adults; *Eur J Cardiothorac Surg*; 2000; **17**; 77-83.
- 205.; YNDGAARD S, ANDERSEN LW, ANDERSEN C, PETTERSON G, BAEK L; The effect of modified ultrafiltration on the amount of circulating endotoxins in children undergoing cardiopulmonary bypass; *J Cardiothorac Vasc Anesth*; 2000; **14**; 399-401.
- 206.; ABDUL-KHALIQ H, SCHUBERT S, TROITZSCH D, WEHSACK A, BÖTTCHER W, GUTSCH E, HÜBLER M, SCHMITT B, CRAUSAZ M, SCHWALLER B, CELIO M, STOLTENBURG-DIDINGER G, BLASIG I, VOLK H-D, LIEBENTHAL C, HETZER R, LANGE PE; Ein neonatales Schweinmodell zur Evaluierung neuroprotektiver Strategien in der Kinderherzchirurgie ; *Z Herz Thorax Gefäßchir* ; 2001; **15**; 1-8
- 207.; ABDUL-KHALIQ H, TROITZSCH D, SCHUBERT S, WEHSACK A, BOETTCHER W, GUTSCH E, HUBLER M, HERTZER R, LANGE PE; Cerebral Oxygen Monitoring during Neonatal Cardiopulmonary Bypass and Deep Hypothermic Circulatory Arrest; *Thoracic Cardiovasc Surg*, (Im Druck); 2002.; ;
-

- 208.; SOMOGYI P, TAGAKI H; A note on the use of picric acid-paraformaldehyde-glutaraldehyde fixative for correlated light and electron microscopic immunocytochemistry; Neuroscience; 1982; **7**; 1779 - 1783.
- 209.; SCHMECHEL D, MARANGOS PJ, ZIS AP, BRIGHTMAN M, GOODWIN FK; Brain endolases as specific markers of neuronal and glial cells; Science; 1978; **199**; 313-5.
- 210.; MARANGOS PJ, SCHMECHEL D, PARMA AM, CLARK RL, GOODWIN FK; Measurement of neuron-specific (NSE) and non-neuronal (NNE) isoenzymes of enolase in rat, monkey and human nervous tissue; J Neurochem; 1979; **33**; 319-29.
- 211.; CELIO MR, BAIER W, SCHARER L, DE VIRAGH PA, GERDAY C; Monoclonal antibodies directed against the calcium binding protein parvalbumin; Cell Calcium; 1988; **9**; 81-6.
- 212.; SIESJO BK, KATSURA K, ZHAO Q, FOLBERGROVA J, PAHLMARK K, SIESJO P, SMITH ML; Mechanisms of secondary brain damage in global and focal ischemia a speculative synthesis; J Neurotrauma; 1995; **12**; 943-56.
- 213.; SIESJO BK, SIESJO P; Mechanisms of secondary brain injury; Eur J Anaesthesiol; 1996; **13**; 247-68.
- 214.; NICOTERA P, ORRENIUS S; The role of calcium in apoptosis; Cell Calcium; 1998; **23**; 173-80.
- 215.; SIESJO BK, HU B, KRISTIAN T; Is the cell death pathway triggered by the mitochondrion or the endoplasmic reticulum? J Cereb Blood Flow Metab; ; 1999; **19**; 19-26.
- 216.; KRISTIAN T, GIDO G, SIESJO BK; Brain calcium metabolism in hypoglycemic coma; J Cereb Blood Flow Metab; 1993; **13**; 955-61.
- 217.; MEHMET H, YUE X, PENRICE J, CADY E, WYATT JC, SARRAF C, SQUIER M, EDWARDS AD; Relation of impaired energy metabolism to apoptosis and necrosis following transient cerebral hypoxia-ischaemia; Cell Death Differ; 1998; **5**; 321-9.
- 218.; KERR JF, WYLLIE AH, CURRIE AR; Apoptosis a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics; Br J Cancer; 1972; **26**; 239-57.
- 219.; KERR JF; Shrinkage necrosis of adrenal cortical cells; J Pathol; 1972; **107**; 217-9.
- 220.; KERR JF, GAFFNEY TJ, MCGEARY HM, DUHIG RE, NICOLAIDES NJ; Malakoplakia an electron-microscope and chemical study; J Pathol; 1972; **107**; 289-94.
-

- 221.; WYLLIE AH, KERR JF, CURRIE AR; Cell death the significance of apoptosis; *Int Rev Cytol*; 1980; **68**; 251-306.
- 222.; WYLLIE AH; Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation; *Nature*; 1980; **284**; 555-6.
- 223.; SIESJO BK, ELMER E, JANELIDZE S, KEEP M, KRISTIAN T, OUYANG YB, UCHINO H; Role and mechanisms of secondary mitochondrial failure; *Acta Neurochir Suppl (Wien)*; 1999; **73**; 7-13.
- 224.; NICOTERA P, LEIST M, FERRANDO-MAY E; Intracellular ATP, a switch in the decision between apoptosis and necrosis; *Toxicol Lett*; 1998; **102-103**; 139-42.
- 225.; HU BR, LIU CL, OUYANG Y, BLOMGREN K, SIESJO BK; Involvement of caspase-3 in cell death after hypoxia-ischemia declines during brain maturation; *J Cereb Blood Flow Metab*; 2000; **20**; 1294-300.
- 226.; FULLE S, PIETRANGELO T, MARIGGIO MA, LORENZON P, RACANICCHI L, MOZRZYMAS J, GUARNIERI S, ZUCCONI-GRASSI G, FANO G; Calcium and fos involvement in brain-derived Ca(2+)-binding protein (S100)-dependent apoptosis in rat pheochromocytoma cells; *Exp Physiol*; 2000; **85**; 243-53.
- 227.; KIN H, ISHIBASHI K, NITATORI T, KAWAZOE K; Hippocampal neuronal death following deep hypothermic circulatory arrest in dogs involvement of apoptosis; *Cardiovasc Surg*; 1999; **7**; 558-64.
- 228.; YUAN J, YANKNER BA; Apoptosis in the nervous system; *Nature*; 2000; **407**; 802-9.
- 229.; AKHTER W, ASHRAF QM, ZANELLI SA, MISHRA OP, DELIVORIA-PAPADOPOULOS M; Effect of graded hypoxia on cerebral cortical genomic DNA fragmentation in newborn piglets; *Biol Neonate*; 2001; **79**; 187-93.
- 230.; LEIST M, NICOTERA P; Apoptosis versus necrosis the shape of neuronal cell death; *Results Probl Cell Differ*; 1998; **24**; 105-35
- 231.; ALMEIDA OF, CONDE GL, CROCHEMORE C, DEMENEIX BA, FISCHER D, HASSAN AH, MEYER M, HOLSBOER F, MICHAELIDIS TM; Subtle shifts in the ratio between pro- and antiapoptotic molecules after activation of corticosteroid receptors decide neuronal fate; *Faseb J*; 2000; **14**; 779-90.
-

- 232.; LIPTON SA, NICOTERA P; Calcium, free radicals and excitotoxins in neuronal apoptosis; Cell Calcium; 1998; **23**; 165-71.
- 233.; ABDUL-KHALIQ H, SCHUBERT S, STOLTENBURG-DIDINGER G; Neuroprotective effects of pre-treatment with systemic steroids in a neonatal piglet model of cardiopulmonary bypass with deep hypothermic circulatory arrest; Eur J Cardiothorac Surg; 2000; **18**; 729-31.
- 234.; KURTH CD, STEVEN JM, NICOLSON SC, JACOBS ML; Cerebral oxygenation during cardiopulmonary bypass in children discussion 78-9; J Thorac Cardiovasc Surg; 1997; **113**; 71-8
- 235.; AOKI M, JONAS RA, NOMURA F, KAWATA H, HICKEY PR; Anti-CD18 attenuates deleterious effects of cardiopulmonary bypass and hypothermic circulatory arrest in piglets; J Card Surg; 1995; **10**; 407-17.
- 236.; KERN FH, SCHELL RM, GREELEY WJ; Cerebral monitoring during cardiopulmonary bypass in children; J Neurosurg Anesthesiol; 1993; **5**; 213-7.
- 237.; NOLLERT G, JONAS RA, REICHART B; Optimizing cerebral oxygenation during cardiac surgery a review of experimental and clinical investigations with near infrared spectrophotometry; Thorac Cardiovasc Surg; 2000; **48**; 247-53
- 238.; GRUBER EM, JONAS RA, NEWBURGER JW, ZURAKOWSKI D, HANSEN DD, LAUSSEN PC; The effect of hematocrit on cerebral blood flow velocity in neonates and infants undergoing deep hypothermic cardiopulmonary bypass; Anesth Analg; 1999; **89**; 322-7.
- 239.; MEZROW CK, GANDSAS A, SADEGHI AM, MIDULLA PS, SHIANG HH, GREEN R, HOLZMAN IR, GRIEPP RB; Metabolic correlates of neurologic and behavioral injury after prolonged hypothermic circulatory arrest; J Thorac Cardiovasc Surg; 1995; **109**; 959-75.
- 240.; MEZROW CK, MIDULLA PS, SADEGHI AM, GANDSAS A, WANG W, DAPUNT OE, ZAPPULLA R, GRIEPP RB; Evaluation of cerebral metabolism and quantitative electroencephalography after hypothermic circulatory arrest and low- flow cardiopulmonary bypass at different temperatures; J Thorac Cardiovasc Surg; 1994; **107**; 1006-19.
- 241.; TSUI SS, KIRSHBOM PM, DAVIES MJ, JACOBS MT, GREELEY WJ, KERN FH, GAYNOR JW, UNGERLEIDER RM; Nitric oxide production affects cerebral perfusion and metabolism after deep hypothermic circulatory arrest; Ann Thorac Surg; 1996; **61**; 1699-707.
-

- 242.; BRAUGHLER JM, HALL ED, MEANS ED, WATERS TR, ANDERSON DK; Evaluation of an intensive methylprednisolone sodium succinate dosing regimen in experimental spinal cord injury; J Neurosurg; 1987; **67**; 102-5.
- 243.; ROSENBERG LJ, JORDAN RS, GROSS GW, EMERY DG, LUCAS JH; Effects of methylprednisolone on lesioned and uninjured mammalian spinal neurons viability, ultrastructure, and network electrophysiology; J Neurotrauma; 1996; **13**; 417-37.
- 244.; LIU Y, COUSIN JM, HUGHES J, VAN DAMME J, SECKL JR, HASLETT C, DRANSFIELD I, SAVILL J, ROSSI AG; Glucocorticoids promote nonphlogistic phagocytosis of apoptotic leukocytes; J Immunol; 1999; **162**; 3639-46.
- 245.; HALL ED; The neuroprotective pharmacology of methylprednisolone; J Neurosurg; 1992; **76**; 13-22.
- 246.; LIU D, MCADOO DJ; Methylprednisolone reduces excitatory amino acid release following experimental spinal cord injury; Brain Res; 1993; **609**; 293-7.
- 247.; BREMER AM, YAMADA K, WEST CR; Ischemic cerebral edema in primates effects of acetazolamide, phenytoin, sorbitol, dexamethasone, and methylprednisolone on brain water and electrolytes; Neurosurgery; 1980; **6**; 149-54
- 248.; BRACKEN MB; Treatment of acute spinal cord injury with methylprednisolone results of a multicenter, randomized clinical trial discussion S51-2.; J Neurotrauma; 1991; **8 Suppl 1**; S47-50
- 249.; TABARDEL Y, DUCHATEAU J, SCHMARTZ D, MARECAUX G, SHAHLA M, BARVAIS L, LECLERC JL, VINCENT JL; Corticosteroids increase blood interleukin-10 levels during cardiopulmonary bypass in men; Surgery; 1996; **119**; 76-80.
- 250.; CHANEY MA, NIKOLOV MP, BLAKEMAN B, BAKHOS M, SLOGOFF S; Pulmonary effects of methylprednisolone in patients undergoing coronary artery bypass grafting and early tracheal extubation [see comments]; Anesth Analg; 1998; **87**; 27-33.
- 251.; SABATINI DM, LAI MM, SNYDER SH; Neural roles of immunophilins and their ligands; Mol Neurobiol; 1997; **15**; 223-39.
- 252.; LIU J, FARMER JD, JR., LANE WS, FRIEDMAN J, WEISSMAN I, SCHREIBER SL; Calcineurin is a common target of cyclophilin-cyclosporin A and FKBP-FK506 complexes; Cell; 1991; **66**; 807-15.
-

- 253.; FRIEDMAN J, WEISSMAN I; Two cytoplasmic candidates for immunophilin action are revealed by affinity for a new cyclophilin; one in the presence and one in the absence of CsA; *Cell*; 1991; **66**;799-806.
- 254.; SNYDER SH, SABATINI DM, LAI MM, STEINER JP, HAMILTON GS, SUZDAK PD; Neural actions of immunophilin ligands; *Trends Pharmacol Sci*; 1998; **19**; 21-6.
- 255.; STEINER JP, DAWSON TM, FOTUHI M, GLATT CE, SNOWMAN AM, COHEN N, SNYDER SH; High brain densities of the immunophilin FKBP colocalized with calcineurin; *Nature*; 1992; **358**; 584-7.
- 256.; STEINER JP, DAWSON TM, FOTUHI M, SNYDER SH; Immunophilin regulation of neurotransmitter release; *Mol Med*; 1996; **2**; 325-33.
- 257.; GRIMM M, YEGANEHFAR W, LAUFER G, MADL C, KRAMER L, EISENHUBER E, SIMON P, KUPILIK N, SCHREINER W, PACHER R, BUNZEL B, WOLNER E, GRIMM G; Cyclosporine may affect improvement of cognitive brain function after successful cardiac transplantation; *Circulation*; 1996; **94**; 1339-45.
- 258.; GIJTENBEEK JM, VAN DEN BENT MJ, VECHT CJ; Cyclosporine neurotoxicity a review; *J Neurol*; 1999; **246**; 339-46
- 259.; UCHINO H, ELMER E, UCHINO K, LI PA, HE QP, SMITH ML, SIESJO BK; Amelioration by cyclosporin A of brain damage in transient forebrain ischemia in the rat; *Brain Res*; 1998; **812**; 216-26.
- 260.; SULLIVAN PG, THOMPSON M, SCHEFF SW; Continuous infusion of cyclosporin A postinjury significantly ameliorates cortical damage following traumatic brain injury; *Exp Neurol*; 2000; **161**; 631-7.
- 261.; KONDO Y, OGAWA N, ASANUMA M, NISHIBAYASHI S, IWATA E, MORI A; Cyclosporin A prevents ischemia-induced reduction of muscarinic acetylcholine receptors with suppression of microglial activation in gerbil hippocampus; *Neurosci Res*; 1995; **22**; 123-7.
- 262.; HAGL C, TATTON NA, WEISZ DJ, ZHANG N, SPIELVOGEL D, SHIANG HH, BODIAN CA, GRIEPP RB; Cyclosporine A as a potential neuroprotective agent a study of prolonged hypothermic circulatory arrest in a chronic porcine model; *Eur J Cardiothorac Surg*; 2001; **19**; 756-64.
-

- 263.; BRONSTER DJ, CHODOFF L, YONOVER P, SHEINER PA; Cyclosporine levels in cerebrospinal fluid after liver transplantation; Transplantation; 1999; **68**; 1410-3.
- 264.; WANG Q, YANG H, MILLER DW, ELMQUIST WF; Effect of the p-glycoprotein inhibitor, cyclosporin A, on the distribution of rhodamine-123 to the brain an in vivo microdialysis study in freely moving rats; Biochem Biophys Res Commun; 1995; **211**; 719-26.
- 265.; TSUJI A, TAMAI I, SAKATA A, TENDA Y, TERASAKI T; Restricted transport of cyclosporin A across the blood-brain barrier by a multidrug transporter, P-glycoprotein; Biochem Pharmacol; 1993; **46**; 1096-9.
- 266.; OKONKWO DO, BUKI A, SIMAN R, POVLISHOCK JT; Cyclosporin A limits calcium-induced axonal damage following traumatic brain injury; Neuroreport; 1999; **10**; 353-8.
- 267.; FRIBERG H, CONNERN C, HALESTRAP AP, WIELOCH T; Differences in the activation of the mitochondrial permeability transition among brain regions in the rat correlate with selective vulnerability; J Neurochem; 1999; **72**; 2488-97.
- 268.; FRIBERG H, FERRAND-DRAKE M, BENGTSSON F, HALESTRAP AP, WIELOCH T; Cyclosporin A, but not FK 506, protects mitochondria and neurons against hypoglycemic damage and implicates the mitochondrial permeability transition in cell death; J Neurosci; 1998; **18**; 5151-9.
- 269.; DAWSON TM, STEINER JP, LYONS WE, FOTUHI M, BLUE M, SNYDER SH; The immunophilins, FK506 binding protein and cyclophilin, are discretely localized in the brain relationship to calcineurin; Neuroscience; 1994; **62**; 569-80.
- 270.; DAWSON TM, STEINER JP, DAWSON VL, DINERMAN JL, UHL GR, SNYDER SH; Immunosuppressant FK506 enhances phosphorylation of nitric oxide synthase and protects against glutamate neurotoxicity; Proc Natl Acad Sci U S A; 1993; **90**; 9808-12.
- 271.; TANAKA K, FUKUUCHI Y, NOZAKI H, NAGATA E, KONDO T, KOYAMA S, DEMBO T; Calcineurin inhibitor, FK506, prevents reduction in the binding capacity of cyclic AMP-dependent protein kinase in ischemic gerbil brain; J Cereb Blood Flow Metab; 1997; **17**; 412-20.
- 272.; SHARKEY J, BUTCHER SP; Immunophilins mediate the neuroprotective effects of FK506 in focal cerebral ischaemia; Nature; 1994; **371**; 336-9.
- 273.; UTENS EM, VERHULST FC, DUIVENVOORDEN HJ, MEIJBOOM FJ, ERDMAN RA, HESS J; Prediction of behavioural and emotional problems in children and adolescents with operated congenital heart disease; Eur Heart J; 1998; **19**; 801-7.
-

- 274.; MESSMER BJ, SCHALLBERGER U, GATTIKER R, SENNING A; Psychomotor and intellectual development after deep hypothermia and circulatory arrest in early infancy; J Thorac Cardiovasc Surg; 1976; **72**; 495-502.
- 275.; SZYMONOWICZ W, WALKER AM, YU VY, STEWART ML, CANNATA J, CUSSEN L; Regional cerebral blood flow after hemorrhagic hypotension in the preterm, near-term, and newborn lamb; Pediatr Res; 1990; **28**; 361-6.
- 276.; ABDUL-KHALIQ H, GAMILLSCHEG A, UHLEMANN F, HETZER R, LANGE PE; Alteration of cerebral blood flow velocity (CBFV) in neonates and infants after cardiac surgery, Relation to the occurrence of cerebral injury? In; Ennker J CJ, Treasure T, ed Cerebral protection in cerebrovascular and aortic surgery; 1997; ; Steinkopf Darmstadt; 103-112
- 277.; VERHEIJEN PM, LISOWSKI LA, STOUTENBEEK P, HITCHCOCK JF, BRENNER JI, COPEL JA, KLEINMAN CS, MEIJBOOM EJ, BENNINK GB; Prenatal diagnosis of congenital heart disease affects preoperative acidosis in the newborn patient; J Thorac Cardiovasc Surg; 2001; **121**; 798-803.
- 278.; KARL T, FORD G, KELLY E., MEE RBB., WEINTRAUB R., BRIZAR CPR., COCHRANE A., HALL S.; Arterial switch and neurodevelopmental outcome full flow CPB with limited circulatory arrest; In Congenital Heart Disease Session C-2, 81st Annual Meeting of the American Association for Thoracic Surgery (AATS) San Diego, California, USA, 6.-9 Mai AATS; 2001.
- 279.; IKONOMIDOU C, BITTIGAU P, KOCH C, GENZ K, HOERSTER F, FELDERHOFF-MUESER U, TENKOVA T, DIKRANIAN K, OLNEY JW; Neurotransmitters and apoptosis in the developing brain; Biochem Pharmacol; 2001; **62**; 401-5.
- 280.; FELDERHOFF-MUESER U, IKONOMIDOU C; Mechanisms of neurodegeneration after paediatric brain injury; Curr Opin Neurol; 2000; **13**; 141-5.
- 281.; LITASOVA EE, LOMIVIROTOV VN, GORBATICH JN, SHUNKIN AV, VLASSOV JA; Deep hypothermia without extracorporeal circulation in surgery of congenital cardiac defects; J Cardiovasc Surg (Torino); 1994; **35**; 45-52.
- 282.; DITTRICH H, BÜHRER, C., GRIMMER, I., DITTRICH, S., ABDUL-KHALIQ, H., LANGE, P.E; Cardiac surgery in infancy Neurodevelopment at one year of age; Heart (in Review); 2002.;
-

- 283.; SHIN'OKA T, NOLLERT G, SHUM-TIM D, DU PLESSIS A, JONAS RA; Utility of near-infrared spectroscopic measurements during deep hypothermic circulatory arrest; *Ann Thorac Surg*; 2000; **69**; 578-83.
- 284.; KURTH CD, STEVEN JM, BENARON D, CHANCE B; Near-infrared monitoring of the cerebral circulation; *J Clin Monit*; 1993; **9**; 163-70.
- 285.; LAURSEN H, BODKER A, ANDERSEN K, WAABEN J, HUSUM B; Brain oedema and blood-brain barrier permeability in pulsatile and nonpulsatile cardiopulmonary bypass; *Scand J Thorac Cardiovasc Surg*; 1986; **20**; 161-6.
- 286.; LAURSEN H, WAABEN J, GEFKE K, HUSUM B, ANDERSEN LI, SORENSEN HR; Brain histology, blood-brain barrier and brain water after normothermic and hypothermic cardiopulmonary bypass in pigs; *Eur J Cardiothorac Surg*; 1989; **3**; 539-43.
- 287.; RODRIGUEZ RA, AUSTIN EH, 3RD, AUDENAERT SM; Postbypass effects of delayed rewarming on cerebral blood flow velocities in infants after total circulatory arrest discussion 1690-1.; *J Thorac Cardiovasc Surg*; 1995; **110**; 1686-90
- 288.; VAN BEL F, VAN DE BOR M, STIJNEN T, BAAN J, RUYS JH; Aetiological role of cerebral blood-flow alterations in development and extension of peri-intraventricular haemorrhage; *Dev Med Child Neurol*; 1987; **29**; 601-14.
- 289.; DAUBENEY PE, SMITH DC, PILKINGTON SN, LAMB RK, MONRO JL, TSANG VT, LIVESEY SA, WEBBER SA; Cerebral oxygenation during paediatric cardiac surgery identification of vulnerable periods using near infrared spectroscopy; *Eur J Cardiothorac Surg*; 1998; **13**; 370-7.
- 290.; ABDUL-KHALIQ H RK, TROITZSCH D, EWERT P, KRETSCHMAR O, BERGER P, LANGE PE; Transcranial measurement of regional cerebral hemoglobin saturation by near infrared spectroscopy provide non-invasive information on cerebral venous blood saturation in infants and children; *Cardiovascular Engineering*; 2000; **5**; 257-260
- 291.; NOLLERT G, MOHNLE P, TASSANI-PRELL P, UTTNER I, BORASIO GD, SCHMOECKEL M, REICHART B; Postoperative neuropsychological dysfunction and cerebral oxygenation during cardiac surgery; *Thorac Cardiovasc Surg*; 1995; **43**; 260-4.
- 292.; KADOI Y, KAWAHARA F, SAITO S, MORITA T, KUNIMOTO F, GOTO F, FUJITA N; Effects of hypothermic and normothermic cardiopulmonary bypass on brain oxygenation; *Ann Thorac Surg*; 1999; **68**; 34-9.
-

- 293.; RÜTZLER K; Veränderung der regionalen zerebralen Hämoglobinsättigung nach Korrekturoperation angeborener Herzfehler; In Kinderkardiologie Berlin Humboldt Universität Berlin; 2001.
- 294.; TSUJI M, DUPLESSIS A, TAYLOR G, CROCKER R, VOLPE JJ; Near infrared spectroscopy detects cerebral ischemia during hypotension in piglets; *Pediatr Res*; 1998; **44**; 591-5.
- 295.; CHANG YS, PARK WS, LEE M, KIM KS, SHIN SM, CHOI JH; Near infrared spectroscopic monitoring of secondary cerebral energy failure after transient global hypoxia-ischemia in the newborn piglet; *Neurol Res*; 1999; **21**; 216-24.
- 296.; OKADA E, FIRBANK M, DELPY DT; The effect of overlying tissue on the spatial sensitivity profile of near-infrared spectroscopy; *Phys Med Biol*; 1995; **40**; 2093-108.
- 297.; DUNCAN A, MEEK JH, CLEMENCE M, ELWELL CE, FALLON P, TYSZCZUK L, COPE M, DELPY DT; Measurement of cranial optical path length as a function of age using phase resolved near infrared spectroscopy; *Pediatr Res*; 1996; **39**; 889-94.
- 298.; FIRBANK M, ARRIDGE SR, SCHWEIGER M, DELPY DT; An investigation of light transport through scattering bodies with non-scattering regions; *Phys Med Biol*; 1996; **41**; 767-83.
- 299.; FERRARI M, HANLEY DF, WILSON DA, TRAYSTMAN RJ; Redox changes in cat brain cytochrome-c oxidase after blood-fluorocarbon exchange; *Am J Physiol*; 1990; **258**; H1706-13.
- 300.; FERRARI M, WILLIAMS MA, WILSON DA, THAKOR NV, TRAYSTMAN RJ, HANLEY DF; Cat brain cytochrome-c oxidase redox changes induced by hypoxia after blood-fluorocarbon exchange transfusion; *Am J Physiol*; 1995; **269**; H417-24.
- 301.; ABDUL-KHALIQ H, ALEXI-MESKHISHVILI V, LANGE PE; Serum S-100 protein levels after pediatric cardiac surgery a possible new marker for postperfusion cerebral injury; *J Thorac Cardiovasc Surg*; 1999; **117**; 843-4.
- 302.; RÜTZLER K, ABDUL-KHALIQ H, UHLIG R, DÄHNERT I, ALEXI-MESKISHVILI V, ABRAHAM K, HETZER R, LANGE PE; Altersabhängigkeit des nachweisbaren Serumproteins S-100 während und nach Korrekturoperation angeborener Herzfehler im Kleinkindesalter; *Z Herz Thorax Gefäßchir*; 1998; **12**; 2-7.
- 303.; ERB MA, HEINEMANN MK, WENDEL HP, HABERLE L, SIEVERDING L, SPEER CP, ZIEMER G; S-100 after correction of congenital heart defects in neonates is it a reliable marker for cerebral damage?; *Ann Thorac Surg*; 2000; **69**; 1515-9.
-

- 304.; SIESJO BK; Calcium and cell death; Magnesium; 1989; **8**; 223-37.
- 305.; SCHAFER BW, FRITSCHY JM, MURMANN P, TROXLER H, DURUSSEL I, HEIZMANN CW, COX JA; Brain S100A5 is a novel calcium-, zinc-, and copper ion-binding protein of the EF-hand superfamily; J Biol Chem; 2000; **275**; 30623-30.
- 306.; CERUTTI SM, CHADI G; S100 immunoreactivity is increased in reactive astrocytes of the visual pathways following a mechanical lesion of the rat occipital cortex; Cell Biol Int; 2000; **24**; 35-49.
- 307.; BARGER SW, VAN ELDIK LJ, MATTSON MP; S100 beta protects hippocampal neurons from damage induced by glucose deprivation; Brain Res; 1995; **677**; 167-70.
- 308.; CACERES MJ, SCHLEIEN CL, KULUZ JW, GELMAN B, DIETRICH WD; Early endothelial damage and leukocyte accumulation in piglet brains following cardiac arrest; Acta Neuropathol (Berl); 1995; **90**; 582-91.
- 309.; LIU D, SMITH CL, BARONE FC, ELLISON JA, LYSKO PG, LI K, SIMPSON IA; Astrocytic demise precedes delayed neuronal death in focal ischemic rat brain; Brain Res Mol Brain Res; 1999; **68**; 29-41.
- 310.; LINDBERG L, OLSSON AK, ANDERSON K, JOGI P; Serum S-100 protein levels after pediatric cardiac operations a possible new marker for postperfusion cerebral injury; J Thorac Cardiovasc Surg; 1998; **116**; 281-5.
- 311.; HERRMANN M, EBERT AD, TOBER D, HANN J, HUTH C; A contrastive analysis of release patterns of biochemical markers of brain damage after coronary artery bypass grafting and valve replacement and their association with the neurobehavioral outcome after cardiac surgery; Eur J Cardiothorac Surg; 1999; **16**; 513-8.
- 312.; NAGDYMAN N, KOMEN W, KO HK, MULLER C, OBLADEN M; Early biochemical indicators of hypoxic-ischemic encephalopathy after birth asphyxia; Pediatr Res; 2001; **49**; 502-6.
- 313.; BETZ AL, KEEP RF, BEER ME, REN XD; Blood-brain barrier permeability and brain concentration of sodium, potassium, and chloride during focal ischemia; J Cereb Blood Flow Metab; 1994; **14**; 29-37.
- 314.; KEEP RF, ENNIS SR, BEER ME, BETZ AL; Developmental changes in blood-brain barrier potassium permeability in the rat relation to brain growth; J Physiol; 1995; **488**; 439-48.
-

- 315.; JORGENSEN EO; Neurological and circulatory outcomes of cardiopulmonary resuscitation in progress influence of pre-arrest and arrest factors; *Resuscitation*; 1998; **36**; 45-9.
- 316.; JORGENSEN EO, HOLM S; The course of circulatory and cerebral recovery after circulatory arrest influence of pre-arrest, arrest and post-arrest factors; *Resuscitation*; 1999; **42**; 173-82.
- 317.; ZIMMER DB; Examination of the calcium-modulated protein S100 alpha and its target proteins in adult and developing skeletal muscle; *Cell Motil Cytoskeleton*; 1991; **20**; 325-37.
- 318.; JONSSON H, JOHNSON P, ALLING C, BACKSTROM M, BERGH C, BLOMQUIST S; S100beta after coronary artery surgery release pattern, source of contamination, and relation to neuropsychological outcome; *Ann Thorac Surg*; 1999; **68**; 2202-8.
- 319.; ANDERSON RE, HANSSON LO, NILSSON O, LISKI J, SETTERGREN G, VAAGE J; Increase in serum S100A1-B and S100BB during cardiac surgery arises from extracerebral sources; *Ann Thorac Surg*; 2001; **71**; 1512-7.
- 320.; CENTENO JM, ORTI M, SALOM JB, SICK TJ, PEREZ-PINZON MA; Nitric oxide is involved in anoxic preconditioning neuroprotection in rat hippocampal slices; *Brain Res*; 1999; **836**; 62-9.
- 321.; THOMAS JE, ROSENWASSER RH, ARMONDA RA, HARROP J, MITCHELL W, GALARIA I; Safety of intrathecal sodium nitroprusside for the treatment and prevention of refractory cerebral vasospasm and ischemia in humans; *Stroke*; 1999; **30**; 1409-16.
- 322.; SALOM JB, BARBERA MD, CENTENO JM, ORTI M, TORREGROSA G, ALBORCH E; Relaxant effects of sodium nitroprusside and NONOates in goat middle cerebral artery delayed impairment by global ischemia-reperfusion; *Nitric Oxide*; 1999; **3**; 85-93.
- 323.; TSAI MJ, LEE EH; Nitric oxide donors protect cultured rat astrocytes from 1-methyl-4-phenylpyridinium-induced toxicity; *Free Radic Biol Med*; 1998; **24**; 705-13.
- 324.; SPORBERT A, MERTSCH K, SMOLENSKI A, HASELOFF RF, SCHONFELDER G, PAUL M, RUTH P, WALTER U, BLASIG IE; Phosphorylation of vasodilator-stimulated phosphoprotein a consequence of nitric oxide- and cGMP-mediated signal transduction in brain capillary endothelial cells and astrocytes; *Brain Res Mol Brain Res*; 1999; **67**; 258-66.
- 325.; ONOE M, OKU H, KITAYAMA H, MATSUMOTO T, KANEDA T; Modified ultrafiltration may improve postoperative pulmonary function in children with a ventricular septal defect; *Surg Today*; 2001; **31**; 586-90.
-

- 326.; CHEW MS, BRANDSLUND I, BRIX-CHRISTENSEN V, RAVN HB, HJORTDAL VE, PEDERSEN J, HJORTDAL K, HANSEN OK, TONNESEN E; Tissue injury and the inflammatory response to pediatric cardiac surgery with cardiopulmonary bypass a descriptive study discussion 5A; *Anesthesiology*; 2001; **94**; 745-53
- 327.; ONOE M, MAGARA T, YAMAMOTO Y, NOJIMA T; Modified ultrafiltration removes serum interleukin-8 in adult cardiac surgery; *Perfusion*; 2001; **16**; 37-42.
- 328.; BÖTTCHER W, ALEXI-MESKISHVILI V., HETZER, R; Geschichtliche Entwicklung der extrakorporalen Zirkulation Isolierte Organperfusion im 19 Jahrhundert; *Z Herz- Thorax-Gefäßchirur*; 2000; **14**; 93-99.
- 329.; O'ROURKE MM, NORK KM, KURTH CD; Neonatal cerebral oxygen regulation after hypothermic cardiopulmonary bypass and circulatory arrest; *Crit Care Med*; 2000; **28**; 157-62.
- 330.; NAGASHIMA M, SHIN'OKA T, NOLLERT G, SHUM-TIM D, RADER CM, MAYER JE, JR; High-volume continuous hemofiltration during cardiopulmonary bypass attenuates pulmonary dysfunction in neonatal lambs after deep hypothermic circulatory arrest; *Circulation*; 1998; **98**; II378-84.
- 331.; BOVE EL, WEST HL, PASKANIK AM; Hypothermic cardiopulmonary bypass a comparison between alpha and pH stat regulation in the dog; *J Surg Res*; 1987; **42**; 66-73.
- 332.; GAETANI P, MARZATICO F, LOMBARDI D, ADINOLFI D, RODRIGUEZ Y BAENA R; Effect of high-dose methylprednisolone and U74006F on eicosanoid synthesis after subarachnoid hemorrhage in rats; *Stroke*; 1991; **22**; 215-20.
- 333.; MARZATICO F, GAETANI P, BURATTI E, MESSINA AL, FERLENGA P, RODRIGUEZ Y BAENA R; Effects of high-dose methylprednisolone on Na(+)-K+ ATPase and lipid peroxidation after experimental subarachnoid hemorrhage; *Acta Neurol Scand*; 1990; **82**; 263-70.
- 334.; HALL ED; Neuroprotective actions of glucocorticoid and nonglucocorticoid steroids in acute neuronal injury; *Cell Mol Neurobiol*; 1993; **13**; 415-32.
- 335.; BUTTINI M, MIR A, APPEL K, WIEDERHOLD KH, LIMONTA S, GEBICKE-HAERTER PJ, BODDEKE HW; Lipopolysaccharide induces expression of tumour necrosis factor alpha in rat brain inhibition by methylprednisolone and by rolipram; *Br J Pharmacol*; 1997; **122**; 1483-9.
-

- 336.; KIM JS, CHOPP M, GAUTAM SC; High dose methylprednisolone therapy reduces expression of JE/MCP-1 mRNA and macrophage accumulation in the ischemic rat brain; *J Neurol Sci*; 1995; **128**; 28-35.
- 337.; DEFER GL, BARRE J, LEDUDAL P, TILLEMENT JP, DEGOS JD; Methylprednisolone infusion during acute exacerbation of MS plasma and CSF concentrations; *Eur Neurol*; 1995; **35**; 143-8.
- 338.; CHEN TC, MACKIC JB, MCCOMB JG, GIANNOTTA SL, WEISS MH, ZLOKOVIC BV; Cellular uptake and transport of methylprednisolone at the blood-brain barrier; *Neurosurgery*; 1996; **38**; 348-54.
- 339.; STADELMAN C, MEWS I, SRINIVASAN A, DECKWERTH TL, LASSMANN H, BRUCK W; Expression of cell death-associated proteins in neuronal apoptosis associated with pontosubicular neuron necrosis; *Brain Pathol*; 2001; **11**; 273-81.
- 340.; VAN LANDEGHEM FK, FELDERHOFF-MUESER U, MOYSICH A, STADELMANN C, OBLADEN M, BRUCK W, BUHRER C; Fas (CD95/Apo-1)/Fas Ligand Expression in Neonates with Pontosubicular Neuron Necrosis; *Pediatr Res*; 2002; **51**; 129-135.
- 341.; HASSAN AH, VON ROSENSTIEL P, PATCHEV VK, HOLSBOER F, ALMEIDA OF; Exacerbation of apoptosis in the dentate gyrus of the aged rat by dexamethasone and the protective role of corticosterone; *Exp Neurol*; 1996; **140**; 43-52.
- 342.; WANG HD, FUKUDA T, SUZUKI T, HASHIMOTO K, LIOU SY, MOMOI T, KOSAKA T, YAMAMOTO K, NAKANISHI H; Differential effects of Bcl-2 overexpression on hippocampal CA1 neurons and dentate granule cells following hypoxic ischemia in adult mice; *J Neurosci Res*; 1999; **57**; 1-12.
- 343.; YUAN J, YANKNER BA; Caspase activity sows the seeds of neuronal death; *Nat Cell Biol*; 1999; **1**; E44-5.
- 344.; SIESJO BK, ZHAO Q, PAHLMARK K, SIESJO P, KATSURA K, FOLBERGROVA J; Glutamate, calcium, and free radicals as mediators of ischemic brain damage; *Ann Thorac Surg*; 1995; **59**; 1316-20.
- 345.; SIMARD M, COULDWELL WT, ZHANG W, SONG H, LIU S, COTRINA ML, GOLDMAN S, NEDERGAARD M; Glucocorticoids-potent modulators of astrocytic calcium signaling; *Glia*; 1999; **28**; 1-12.
-

- 346.; SIEGMAN MG, ANDERSON RV, BALABAN RS, CECKLER TL, CLARK RE, SWAIN JA; Barbiturates impair cerebral metabolism during hypothermic circulatory arrest; *Ann Thorac Surg*; 1992; **54**; 1131-6.
- 347.; HICSONMEZ G, ERDEMLI E, TEKELIOGLU M, TUNCER AM, OZBEK N, CETIN M, COTTER TG; Morphologic evidence of apoptosis in childhood acute myeloblastic leukemia treated with high-dose methylprednisolone; *Leuk Lymphoma*; 1996; **22**; 91-6, follow.186,color plate VII-III.
- 348.; CHANDRA J, GILBREATH J, FREIREICH EJ, Kliche KO, ANDREEFF M, KEATING M, MCCONKEY DJ; Protease activation is required for glucocorticoid-induced apoptosis in chronic lymphocytic leukemic lymphocytes; *Blood*; 1997; **90**; 3673-81.
- 349.; EDWARDS HE, BURNHAM WM; The impact of corticosteroids on the developing animal; *Pediatr Res*; 2001; **50**; 433-40.
- 350.; BARRINGTON KJ; The adverse neuro-developmental effects of postnatal steroids in the preterm infant a systematic review of RCTs; *BMC Pediatr*; 2001; **1**; 1.
- 351.; TOUNG TJ, BHARDWAJ A, DAWSON VL, DAWSON TM, TRAYSTMAN RJ, HURN PD; Neuroprotective FK506 does not alter in vivo nitric oxide production during ischemia and early reperfusion in rats; *Stroke*; 1999; **30**; 1279-85.
- 352.; FERRAND-DRAKE M, FRIBERG H, WIELOCH T; Mitochondrial permeability transition induced DNA-fragmentation in the rat hippocampus following hypoglycemia; *Neuroscience*; 1999; **90**; 1325-38.
- 353.; YARDIN C, TERRO F, LESORT M, ESCLAIRE F, HUGON J; FK506 antagonizes apoptosis and c-jun protein expression in neuronal cultures; *Neuroreport*; 1998; **9**; 2077-80.
- 354.; KOCHI S, TAKANAGA H, MATSUO H, OHTANI H, NAITO M, TSURUO T, SAWADA Y; Induction of apoptosis in mouse brain capillary endothelial cells by cyclosporin A and tacrolimus; *Life Sci*; 2000; **66**; 2255-60.
- 355.; KOCHI S, TAKANAGA H, MATSUO H, NAITO M, TSURUO T, SAWADA Y; Effect of cyclosporin A or tacrolimus on the function of blood-brain barrier cells; *Eur J Pharmacol*; 1999; **372**; 287-95.
-

- 356.; ASAI A, QIU J, NARITA Y, CHI S, SAITO N, SHINOURA N, HAMADA H, KUCHINO Y, KIRINO T; High level calcineurin activity predisposes neuronal cells to apoptosis; J Biol Chem; 1999; **274**; 34450-8.
- 357.; HERR I, MARTIN-VILLALBA A, KURZ E, RONCAIOLI P, SCHENKEL J, CIFONE MG, DEBATIN KM; FK506 prevents stroke-induced generation of ceramide and apoptosis signaling; Brain Res; 1999; **826**; 210-9.
- 358.; ALEXANIAN AR, BAMBURG JR; Neuronal survival activity of s100betabeta is enhanced by calcineurin inhibitors and requires activation of NF-kappaB; Faseb J; 1999; **13**; 1611-20.
- 359.; SODA Y, EL-ASSAL ON, YU L, NAGASUE N; Suppressed endothelin-1 production by FK506 and cyclosporin A in ischemia/reperfusion of rat small intestine; Surgery; 1999; **125**; 23-32.
- 360.; MUELLER AR, PLATZ KP, BECHSTEIN WO, SCHATTENFROH N, STOLTENBURG-DIDINGER G, BLUMHARDT G, CHRISTE W, NEUHAUS P; Neurotoxicity after orthotopic liver transplantation A comparison between cyclosporine and FK506; Transplantation; 1994; **58**; 155-70.
- 361.; TOROCSIK HV, CURLESS RG, POST J, TZAKIS AG, PEARSE L; FK506-induced leukoencephalopathy in children with organ transplants; Neurology; 1999; **52**; 1497-500.
- 362.; SIESJO BK, BENGTSSON F; Calcium fluxes, calcium antagonists, and calcium-related pathology in brain ischemia, hypoglycemia, and spreading depression a unifying hypothesis; J Cereb Blood Flow Metab; 1989; **9**; 127-40
- 363.; SIESJO BK; Calcium-mediated processes in neuronal degeneration; Ann N Y Acad Sci; 1994; **747**; 140-61.
- 364.; SIESJO BK; Calcium in the brain under physiological and pathological conditions discussion 39-41; Eur Neurol; 1990; **30**; 3-9
- 365.; SCHEFF SW, SULLIVAN PG; Cyclosporin A significantly ameliorates cortical damage following experimental traumatic brain injury in rodents; J Neurotrauma; 1999; **16**; 783-92.
- 366.; WIELOCH T, HARRIS RJ, SIESJO BK; Brain metabolism and ischemia mechanism of cell damage and principles of protection; J Cereb Blood Flow Metab; 1982; **2**; S5-9.
- 367.; WIELOCH T, SIESJO BK; Ischemic brain injury the importance of calcium, lipolytic activities, and free fatty acids; Pathol Biol (Paris); 1982; **30**; 269-77.
-

368.; KRISTIAN T, SIESJO BK; Calcium in ischemic cell death; Stroke; 1998; **29**; 705-18.

369.; TATTON NA, HAGL C, NANDOR S, INSOLIA S, SPIELVOGEL D, GRIEPP RB; Apoptotic cell death in the hippocampus due to prolonged hypothermic circulatory arrest comparison of cyclosporine A and cycloheximide on neuron survival; Eur J Cardiothorac Surg; 2001; **19**; 746-55.

370.; LI PA, HE QP, SIESJO BK; Effects of intracarotid arterial injection of cyclosporin A and spontaneous hypothermia on brain damage incurred after a long period of global ischemia; Brain Res; 2001; **890**; 306-13.

371.; KOIDE T, YAMADA M, TAKAHASHI T, IGARASHI S, MASUKO M, FURUKAWA T, KUROHA T, KOIKE T, SATO M, TANAKA R, TSUJI S, TAKAHASHI H; Cyclosporine A-associated fatal central nervous system angiopathy in a bone marrow transplant recipient an autopsy case; Acta Neuropathol (Berl); 2000; **99**; 680-4.

372.; WARREN KE, PATEL MC, MCCULLY CM, MONTUENGA LM, BALIS FM; Effect of P-glycoprotein modulation with cyclosporin A on cerebrospinal fluid penetration of doxorubicin in non-human primates; Cancer Chemother Pharmacol; 2000; **45**; 207-12.

373.; BEGLEY DJ, SQUIRES LK, ZLOKOVIC BV, MITROVIC DM, HUGHES CC, REVEST PA, GREENWOOD J; Permeability of the blood-brain barrier to the immunosuppressive cyclic peptide cyclosporin A; J Neurochem; 1990; **55**; 1222-30.

374.; MCDONALD JW, GOLDBERG MP, GWAG BJ, CHI SI, CHOI DW; Cyclosporine induces neuronal apoptosis and selective oligodendrocyte death in cortical cultures; Ann Neurol; 1996; **40**; 750-8

11. Danksagung

Dieser Abschnitt meines Lebens wäre ohne die kontinuierliche Unterstützung meiner Eltern und Familie nicht möglich gewesen.

An dieser Stelle möchte ich mich meinem Betreuer bei meiner Doktorarbeit Dr. Ahmad. Hussein und meinem Doktorvater Prof. Dr. Horst von der Hardt von der Medizinischen Hochschule in Hannover bedanken, dass sie mir die wissenschaftliche Methode und das Angehen einer wissenschaftlichen Arbeit beigebracht haben.

Ohne die uneingeschränkte Unterstützung und Begeisterung meines Chefs Prof. Dr. Peter E. Lange für ein nicht-kardiologisches Thema wären diese Arbeiten nie möglich gewesen. Ich danke Frau Prof. Gisela Stoltenburg-Didinger vom neuropathologischen Institut im Klinikum Benjamin Franklin der Freien Universität für ihre uneingeschränkte Hilfe und ihr Engagement bei der morphologischen Bearbeitung des Zentralnervensystems. Ich bin allen meinen Doktoranden verpflichtet, die Themen angenommen und die wissenschaftlichen Arbeiten durchgeführt haben. Besonders gilt mein Dank meinen Doktoranden, Stephan Schubert, Dirk Triotzsch, und Anke Wehsack, die mit großem Interesse zum Etablieren des Tiermodells beigetragen haben. Mein Dank und meine Hochschätzung gelten Herrn Wolfgang Böttcher von der Abteilung Kardiotechnik für seine klugen Anregungen und Hilfe bei der Perfusion der kleinen Tiere. Ich bin allen meinen Kollegen und Mitarbeitern der Abteilung Kinderkardiologie, des Deutschen Herzzentrums Berlin für ihre Hilfe und Unterstützung dankbar.
